UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970 N° 164

ACTION DE CERTAINS ANESTHESIQUES SUR LA LACTICODESHYDROGENASE SERIQUE

Travail du Laboratoire de Chimie Biologique
de la Faculté de Médecine de Toulouse
Professeur VALDIGUIÉ

●

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement en Septembre 1970

par

Annie VALDIGUIÉ
née DASTAN

●

MEMBRES DU JURY

MM.	VALDIGUIÉ....	*Président*
	LARENG.....	*Assesseurs*
	DOUSTE-BLAZY	—
	PASQUIÉ.....	—
	JUSKIEWENSKI.	*Suppléant*

TOULOUSE
IMPRIMERIE DES CAPITOULS
8, Boulevard Matabiau

1970

ACTION DE CERTAINS ANESTHESIQUES

SUR LA

LACTICODESHYDROGENASE SERIQUE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546526_0093

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970 N° 164

ACTION DE CERTAINS ANESTHESIQUES SUR LA LACTICODESHYDROGENASE SERIQUE

Travail du Laboratoire de Chimie Biologique
de la Faculté de Médecine de Toulouse
Professeur VALDIGUIÉ

●

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement en Septembre 1970

par

Annie VALDIGUIÉ
née DASTAN

●

MEMBRES DU JURY

MM.	VALDIGUIÉ....	*Président*
	LARENG.....	*Assesseurs*
	DOUSTE-BLAZY	—
	PASQUIÉ.....	—
	JUSKIEWENSKI.	*Suppléant*

TOULOUSE
IMPRIMERIE DES CAPITOULS
8, Boulevard Matabiau

1970

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN. . . . . MM. LAZORTHES
ASSESSEUR (MEDECINE) . . . . . MONNIER
ASSESSEUR (PHARMACIE) . . . . BREUILLAUD
DOYENS HONORAIRES. . . . . GORSE, CALVET, BRUSTIER.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. VALLOIS TAPIE, DELAS, RISER, BUGNARD, VINCENT, MOREL, BOUISSET, CALMETTES, THOMAS, LAGROT, DULUCQ.

SECTION MEDECINE

Clinique médicale et cardiol. MM. MERIEL
Clinique médicale Sud. . . . . GADRAT
Clinique chirurgicale. . . . . FICAT
Clinique chirurgicale et gynécologique. . . . . FABRE Pierre
Clinique chirurgicale et du cancer. . . . . GRIMOUD
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie. . . . . PASQUIE
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique. . . . RIEUNAU
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire. . . . . ENJALBERT
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques. . . . . BAZEX
Clinique des maladies des voies urinaires. . . . . LHEZ
Clin. des maladies infectieuses N...
Clin. médic. infantile et puéric. SOREL
Clin. méd. de la prem. enfance BARDIER.
Clinique de neuro-chirurgie . . . . LAZORTHES
Clinique neurologique et psychiatrique. . . . . GERAUD
Clinique obstétricale. . . . . PONTONNIER
Clinique odonto-stomatologique CADENAT
Clinique ophtalmologique. . . . . N...
Clinique O.R.L. et chirurgie maxillo-faciale. . . . . CALVET
Clinique de pneumo-phtisiologie DELAUDE
Clinique rhumatologique. . . . . RUFFIE René
Accouchement et obst. soc. . . JAHIER
Anatomie. . . . . BASTIDE
Anatomie appliquée. . . . . POULHES
Anatomie pathologique . . . . . FABRE Jacques
Anesthésie et réanimation . . . . LARENG
Bactériologie et Virologie. . . . . Mme ENJALBERT
Biophysique médicale A. . . . . MM. AUVERGNAT
Biophysique médicale B. . . . . BRU
Chimie biologique. . . . . VALDIGUIE Paul
Electro-radiologie. . . . . MARQUES
Embryologie générale . . . . . BROUSSY Jean
Hématologie . . . . . RUFFIE Jacques
Histologie . . . . . BIMES
Hydrologie thérap. et climat. . . DARNAUD
Hygiène et Médecine Sociale. . MONNIER
Immunologie . . . . . DUCOS
Médecine légale et du travail . . PLANQUES
Pathologie chirurgicale. . . . . DAMBRIN
Pathologie générale et médecine expérimentale. . . . . SENDRAIL
Pathologie médicale . . . . . RIBAUT
Physiologie. . . . . LAPORTE Yves
Physiologie appliquée et pharmacologie. . . . . BAISSET
Sémiologie et Clinique médicale LAPORTE Jacques
Thérapeutique. . . . . DARDENNE

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Histologie et Embryologie . . . . MM. GUILHEM
Anatomie pathologique. . . . . BOUISSOU
Biochimie médicale. . . . . DOUSTE-BLAZY
Histologie et Embryologie. . . . . PLANEL
Maladies infectieuses. . . . . ARMENGAUD
Oto-Rhino-Laryngologie. . . . . CLAUX
Pathologie médicale. . . . . BOULARD
Physiologie. . . . . MONTASTRUC
» . . . . . BESSOU
Physique médicale . . . . . COMMANAY
Pneumo-Phtisiologie. . . . . MIGUERES

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Anatomie pathologique. . . . . FABRE Jean
Bactériologie, Parasitologie, Virologie. . . . . Mme LARENG
Biochimie médicale. . . . . VALDIGUIE Pierre
Chirurgie générale. . . . . GEDEON
» . . . . . SARRAZIN
Chir. thoracique et cardio-vasculaire. . . . . ESCHAPASSE
Electroradiologie. . . . . PONS
» . . . . . ROULLEAU
Méd. générale et thérapeutique BOLLINELLI
Ophtalmologie. . . . . DEODATI
Pédiatrie. . . . . DALOUS
Neurochirurgie. . . . . ESPAGNO Jacque
Médecine gén. et thérapeut. . . SUC
Pédiatrie. . . . . REGNIER
Médecine générale . . . . . RIBET

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Carcinologie. . . . . ESTRADE
Médecine gén. et thérapeut. — BES
Pathologie expérimentale. . . . . GLEIZES
Médecine générale. . . . . ARLET Jacques
Thérap., Réanim. méd., Rééduc. fonctionnelle et Hydrologie . . MM. SALVADOR M.
Radiologie. . . . . COMBES Pierre
Pneumo-Phtisiologie . . . . . ALBAREDE J.L.
Pédiatrie génétique médicale . . ROCHICCIOLI
Chirurgie générale . . . . . ESCAT Jean
» . . . . . COSTAGLIOLA
Orthopédie, Traumatologie, Chir. Plastique et Reconstructive. . UTHEZA Guy
Urologie . . . . . PONTONNIER F.
Histologie, Embry., Cytogénét. SOLEILHAVOUP
Biophysique. . . . . GUIRAUD Robert
Physiologie. . . . . PAGES Bernard
Parasitologie. . . . . LARROUY
Immun., Hémat., Mal. du Sang BIERME Robert
Anatomie et Organogénèse . . JUSKIEWENSKI S

AGREGES

Médecine générale. . . . . CALAZEL
» . . . . . RASCOL
» . . . . . LE TALLEC
Chirurgie générale. . . . . GAUBERT
Dermatologie et syphiligraphie. . DUPRE
Hydrologie. . . . . DENARD
Médecine légale. . . . . GREZES-RUEFF
Neurologie et psychiatrie. . . . . GAYRAL
Obstétrique. . . . . ESPAGNO Guy
Ophtalmologie. . . . . BEC

AGREGE LIBRE

Chirurgie générale . . . . . SOUQUET
Pathologie chirurgicale . . . . . DIEULAFE

MAITRE DE CONFÉRENCES ASSOCIÉ

Psychiatrie. . . . . M. LABOUCARIE

SECTION PHARMACIE

Botanique et cryptogamie. . . . . N...
Chimie analytique. . . . . MM. PITET
Toxic., Hyg. industr. et Hydrol. BOURBON
Chimie pharmaceutique. . . . . BLANC
Microbiologie. . . . . BREUILLAUD
Pharmacie chimique et pharmacodynamie. . . . . CAUJOLLE
Pharmacie galénique et Matière médicale. . . . . STANISLAS
Physiologie, Zoologie et Parasitologie pharmaceutiques. . . . . ROUX

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Pharmacie. . . . . COUTURIER
Sciences Naturelles . . . . . Mme CAUJOLLE
Toxicologie. . . . . M. BROUSSY George

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Chimie organique. . . . . M. BERTRAND
Zoologie. . . . . GAYREL

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Botanique. . . . . Mme LASCOMBES
Microbiologie. . . . . MM. MICHEL G.
Pharmacodynamie. . . . . CROS Jean
Physiologie. . . . . DUMAS J.C.
Pharmacie galéniqe . . . . . ROUFFIAC R.
Chimie biologique . . . . . SOULA G.
Toxicologie . . . . . MALBOSC R.

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire Principal. . . . . M. ROCHE

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats
(Délibération en date du 12 mai 1891.)

A MES PARENTS

A MON MARI

A MES ENFANTS

A TOUS LES MIENS

avec toute ma tendresse

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR VALDIGUIÉ

Professeur de Chimie Biologique,
Biologiste des Hôpitaux,
Chevalier de la Légion d'honneur.

Qui nous a paternellement accueilli dans sa famille puis conseillé tout au long de nos études médicales.

Grâce à lui, ce travail a pu être réalisé. Qu'il trouve ici le témoignage de toute notre affection.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR LARENG

Professeur d'Anesthésie et Réanimation,
Chef du Service de Réanimation Respiratoire,
et du Service d'Assistance Médicale d'Urgence,
Chevalier de l'Ordre National du Mérite,
Président de l'Université Paul-Sabatier.

Nous le remercions de l'aide qu'il a bien voulu nous apporter dans la réalisation de ce travail et l'assurons de notre profond respect.

MONSIEUR LE PROFESSEUR DOUSTE-BLAZY

Professeur de Biochimie Médicale.

Qui a si aimablement accepté de siéger à notre jury de thèse.

Qu'il trouve ici l'assurance de notre très respectueuse amitié.

MONSIEUR LE PROFESSEUR PASQUIÉ

Professeur de Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédique.

Il a accepté d'être notre juge. Nous lui sommes reconnaissants de l'amitié et de la sympathie qu'il nous a toujours témoignées.

MONSIEUR LE PROFESSEUR JUSKIEWENSKI

Maître de Conférences Agrégé d'Anatomie et Organogenèse.

Qu'il trouve ici l'expression de nos remerciements et notre vive amitié.

A CEUX QUI M'ONT APPORTE

DANS LA REALISATION DE CE TRAVAIL

UNE AIDE TRES EFFICACE

MADEMOISELLE MARIE-FRANCE DIRAT

MONSIEUR JEAN VALDIGUIÉ

Avec mes remerciements très cordiaux.

Introduction

Les progrès de la Médecine sont permis par la meilleure connaissance du métabolisme cellulaire normal ou perturbé. C'est en effet au sein des cellules elles-mêmes que résident les troubles métaboliques qui caractérisent nombre d'états pathologiques.

Claude Bernard avait défini le sang comme le milieu intérieur : il a fallu reconnaître que le plasma est seulement un véhicule et que la connaissance de ses constituants a surtout de la valeur par l'image et le compte-rendu qu'elle donne du fonctionnement cellulaire.

Un des progrès récents de la Médecine est né du dosage des enzymes plasmatiques.

Certaines enzymes sont des constituants normaux du sang. Leur dosage, sans grande utilité dans le plasma des sujets sains offre de l'intérêt dans quelques affections ou intoxications. C'est le cas de la cholinestérase qui augmente dans les thyro-toxicoses et chez les diabétiques obèses, Thompson et Trounce [122] et s'abaisse dans les intoxications par les insecticides organo-phosphorés, Barnes et Davies [6], Aldridge et Davies [1].

La plupart des enzymes participant au métabolisme sont localisées dans les cellules et dans leurs diverses parties : suc cellulaire, microsomes, mitochondries, noyaux. Elles y restent normalement fixées puisque leur action catalytique s'y exerce et elles sont absentes dans le plasma ou s'y trouvent en quantité très faible.

Mais lorsqu'une cellule est lésée par un processus pathologique vasculaire, infectieux, toxique ou lorsqu'elle présente un trouble fonctionnel notable elle va perdre tout ou partie de ses enzymes qui vont passer dans le sang.

Le taux plasmatique des enzymes cellulaires augmente alors notablement et leur dosage a un grand intérêt. Il permet en effet de caractériser un trouble pathologique cellulaire et de localiser ce trouble si on connaît la répartition majeure de l'enzyme dans les cellules de un ou plusieurs organes.

Diverses enzymes servent ainsi, pour le diagnostic ou le pronostic clinique, par le dosage de leur accroissement sanguin : transa-

minases, phosphatases, ornithine-carbamyl-transférase, créatine-kinase, aldolase et lacticodéshydrogénase.

C'est cette dernière enzyme que nous nous sommes proposés d'étudier.

Son taux varie en même temps que celui d'autres enzymes (transminases) dans diverses affections ou intoxications et après certaines interventions chirurgicales.

C'est ce dernier point qui a attiré notre attention; quelle est la part de l'acte opératoire et de l'anesthésie dans l'augmentation de la lacticodéshydrogénase sérique ?

Une autre raison nous a fait choisir cette enzyme. Elle existe sous plusieurs formes, les isoenzymes, inégalement réparties dans les divers tissus.

La variation notable d'une des isoenzymes de la lacticodéshydrogénase pourrait donc compléter les renseignements cliniques sur la déficience métabolique d'un tissu, le foie en particulier.

Plan de notre travail

Après un bref rappel de l'enzymologie des lacticodéshydrogénases, de leur action, de leur localisation et des modes de dosage utilisables résultant de nombreux travaux antérieurs, nous envisageons l'état actuel de nos connaissances sur les variations des lacticodéshydrogénases après les interventions chirurgicales nécessitées par diverses affections.

Nous laissons de côté les taux souvent élevés des lacticodéshydrogénases du sang au cours des états pathologiques et des intoxications, ce qui nous aurait amenés à apporter un nombre très important de travaux.

Nous décrivons ensuite nos recherches personnelles.

Frappés par les résultats discordants donnés dans diverses publications et par l'augmentation, habituelle ou tout au moins fréquente, du taux sanguin des lacticodéshydrogénases après les interventions chirurgicales, nous essayons de préciser les variations qui peuvent être dues à la seule anesthésie.

Nous rapportons pour cela un certain nombre de recherches cliniques et expérimentales étayées par des dosages faits chez l'homme et chez le chien.

Après l'exposé des résultats des dosages effectués nous tentons de les interprêter et d'en tirer des conclusions.

Notre travail est schématisé dans le plan suivant :

LES LACTICODESHYDROGÉNASES

BIOCHIMIE

Nature,

Propriétés,

Effecteurs enzymatiques,

Isoenzymes.

DOSAGE

Colorimétrie,

U.V.

Séparation des isoenzymes.

LES VARIATIONS DES LACTICODESHYDROGÉNASES AU COURS DES ANESTHÉSIES

TRAVAUX ANTÉRIEURS

Interventions chirurgicales,

Intoxications,

Anesthésies.

RECHERCHES PERSONNELLES

Méthodes et techniques,

Résultats,

Interprétations.

CONCLUSIONS

BIOCHIMIE

DES

LACTICODESHYDROGENASES

Biochimie

NATURE.

La L-lacticodéshydrogénase est une enzyme oxydo-réductrice de la glycolyse, universellement répandue dans les cellules animales. Elle catalyse l'oxydoréduction du lactate et du pyruvate suivant la réaction :

$$\text{Lactate} + \text{NAD}^+ \rightleftarrows \text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

$$\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH} + \text{NAD}^+ \rightleftarrows \text{CH}_3\text{-CO-COOH} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

La lacticodéshydrogénase (LDH en abrégé) est connue depuis Thunberg [123]. Cet auteur avait reconnu en 1920 l'existence d'une enzyme tissulaire capable d'oxyder le lactate en pyruvate. L'activité de la LDH dans les extraits dépourvus de cellules fut décelée en 1932 par Banga, Szent-Györgyi et Vargha [4].

Cette enzyme est une hétéroprotéine.

Son coenzyme est le NAD, nicotinamide-adénine-dinucléotide.

Elle doit être distinguée des autres déshydrogénases lactiques dont l'accepteur d'hydrogène est différent, oxygène ou cytochrome b_2 et qui se rencontrent chez les micro-organismes.

La lacticodéshydrogénase aérobie de certains « mycobactérium » est une flavoprotéine ainsi que la lacticodéshydrogénase de la levure de bière qui contient une molécule de protohématine et une molécule de flavine-mononucléotide. Ces deux enzymes sont hors de notre étude qui ne s'adresse qu'à la LDH de l'homme ayant le NAD comme coenzyme.

Dans la classification actuelle des enzymes, donnée en 1961 par l'Union Internationale de Biochimie [91], la lacticodéshydrogénase est désignée par les numéros 1-1-1-27.

C'est-à-dire,

1. Classe des oxydoréductases,
1. Sous-classe des enzymes agissant sur le CHOH du donneur.
1. Sous-sous-classe ayant NAD comme accepteur,
27. Place de la lacticodéshydrogénase du L-lactate.

Cette enzyme est une NAD-oxydoréductase appartenant à la série des oxydoréductases transférant l'hydrogène d'une fonction alcool secondaire.

Son apoenzyme est une protéine relativement complexe dont le poids moléculaire est de 135 000 pour l'enzyme du cœur de bœuf, NEILANDS [71], 127 000 pour celle du cœur de porc, PFLEIDERER et JECKEL [80], 140 000 ± 4 000 pour la LDH du cœur de l'homme, NISSELBAUM et BODANSKY [74].

Cette protéine enzymatique est formée de quatre subunités que nous devrons décrire, ROSSMAN, JEFFERY, MAIN et WARREN [100].

Sa teneur en acides aminés a été déterminée par GIBSON et ses collaborateurs [32]. Leucine, valine et acide aspartique, puis
line sont les plus abondants.
sérine, isoleucine, lysine, glycocolle, acide glutamique et pro-

La lacticodéshydrogénase contient des fonctions thiols. Quatre sont indispensables pour l'action enzymatique et sont des constituants des sites actifs, FONDY, EVERSE, DRISCOLL, CASTILLO, STOLZENBACH et KAPLAN [28], HOLBROOK et PFLEIDERER [46, 47].

Cette enzyme a pu être obtenue cristallisée à partir de divers tissus, cœur de bœuf, STRAUB [116], muscle de rat, KUBOWITZ et OTT [57], muscle de lapin, RACKER [86], foie de rat, WIELAND, PFLEIDERER et ORTANDERL [144], cœur humain, NISSELBAUM et BODANSKY [74].

Quel que soit le tissu qui la contienne, la LDH est avant tout localisée dans le cytoplasme. Cependant une petite quantité peut être caractérisée dans les mitochondries et les microsomes. Comme l'action enzymatique ne se fait pas à leur niveau il s'agit d'une synthèse dans les microsomes et d'un passage rapide vers le cytoplasme.

PROPRIETES.

Instable dans les solutions dépourvues de sels, elle est stable dans les solutions salines de pH compris entre 5,0 et 8,5 STRAUB [116].

Son pH optimum est de 7,5 pour la transformation du pyruvate en lactate, de 9 pour la formation de lactate, RICHTERICH [95].

Elle a une mobilité électrophorétique et elle se dirige vers l'anode à pH 8,7.

Une autre propriété méritant d'être signalée dans notre travail est la spécificité. MEYERHOF et LOHMANN [68] ont reconnu que cette enzyme n'agit que sur l'acide L (+) lactique. NEILANDS [71] a confirmé cette spécificité étroite avec l'enzyme cristallisée.

La LDH pourrait cependant agir faiblement sur d'autres substrat tels que l'α-hydroxybutyrate, Green et Brosteaux [35], les α-hydroxyvalérate et -caproate, Allen [2].

ACTION DES EFFECTEURS ENZYMATIQUES

Celle-ci mérite d'être connue en abordant notre travail car elle peut être en relation avec l'objet de nos recherches.

Activateurs.

Peu d'activateurs ont été mentionnés. La sensibilité de la LDH aux variations du pH a pu faire considérer à tort le maintien du pH à sa valeur optimum 7,4 par certains tampons comme une activation.

Inhibiteurs.

La connaissance des inhibiteurs de la lacticodéshydrogénase est également utile à notre travail.

Ceux-ci sont classés en trois groupes par Schwert et Winer [109] :

a) substrats et composés analogues aux substrats,

b) coenzymes et corps analogues,

c) autres composés.

a) *Substrats*

L'inhibition par les substrats est avant tout réalisée par un excès de pyruvate. Celui-ci, bien que substrat essentiel de la réaction enzymatique, inhibe l'action de la LDH, Green et Brosteaux [35] dès qu'il atteint ou dépasse une certaine concentration.

Cette action mise d'abord en évidence pour l'enzyme du cœur de bœuf par Kubowitz et Ott [57] fut retrouvée par Hahala, Glaid et Schwert [37] et confirmée par d'autres auteurs.

Elle se manifeste pour la LDH des divers autres organes, muscle de lapin, Busch et Nair [13] foie de rat, Gibson et collaborateurs [32].

Elle a été retrouvée par Thiers et Vallee [120] pour l'enzyme sérique objet de notre étude.

Le mécanisme de l'action inhibitrice du pyruvate en excés est encore mal élucidé. Il pourrait être :

— soit la combinaison d'une deuxième molécule de pyruvate avec le complexe apoenzyme-NAD-pyruvate, Winer et Schwert [152],

— soit la seule formation d'un complexe ternaire « abortif » formé le LDH, de pyruvate et de NAD, Wuntch, Vesell et Chen [155].

Si la fixation du substrat sur l'enzyme pour former le complexe E S doit se faire par plusieurs points du site actif, l'abondance et l'excès des molécules du substrat risque de limiter à un seul point par molécule le mode de fixation. La réaction enzymatique ultérieure deviendra impossible.

Un autre mécanisme pourrait être la fixation des molécules du pyruvate en excès sur des fonctions de l'enzyme qui devraient rester libres pour la réaction enzymatique normale.

Un travail récent de WUNTCH, CHEN et VESELL [154] conteste la réalité de l'inhibition par le pyruvate et indique que celle-ci ne se produirait que pour des dilutions importantes des liquides ou des homogénats, telles qu'il faut les réaliser pour les essais enzymatiques spectrophotométriques mesurant l'oxydation du NADH, SRERE [112].

A faible concentration de l'enzyme, le complexe abortif se formerait rapidement, tandis qu'il ne serait synthétisé que très lentement aux concentrations physiologiques de la LDH, WUNTCH, VESELL et CHEN [155].

b) *Coenzymes et dérivés.*

Le NADH en grand excès (200 μM) est également inhibiteur, THIERS et VALLEE [120] ainsi que certains de ses dérivés substitués, la 3 benzoyl-pyridine par exemple et la thionicotinamide qui exercent une inhibition, compétitive ou non.

La réduction du NADH entraînée par le vieillissement conduit à la formation d'un nucléotide inhibiteur de la réaction. C'est une cause d'erreur dans les dosages de la LDH, FAWCETT, CIOTTI et KAPLAN [27].

c) *Autres composés*

Les oxalates et les oxamates $^{+}NH_3\text{-}CO\text{-}COO^{-}$ exercent une action inhibitrice, HAKALA et collaborateurs [36], ROSNOWSKA, SAWICKI et KRAWCZYNSKI [99], EMERSON et WILKINSON [26].

L'inhibition par les oxamates tient à une compétition avec le pyruvate; celle que provoquent les oxalates est due à une compétition avec le lactate, NOVOA et collaborateurs [75].

Les malonates et les tartronates (hydroxymalonates) exercent eux-aussi une inhibition, compétitive par rapport au lactate, GREEN et BROSTEAUX [35] non compétitive vis à vis du pyruvate, OTTOLENGHI et DENSTEDT [76, 77].

Non seulement ces acides qui ont fait l'objet d'études particulières mais aussi la plupart des autres acides organiques exercent une action inhibitrice par leur COOH. Le remplacement de COO^{-} par SO_3^{-} dans l'acide benzène-sulfonique maintient

l'action inhibitrice, Baptist et Vestling [5], comme la présence d'un groupe SH en α, Chaffee et Bartlett [16] : les mercapto-monoacides et-diacides tels que les acides mercapto-acétique, mercapto-butyrique et mercapto-succinique, sont eux-aussi inhibiteurs, Dennis et Kaplan [23]. Mais le groupe SH n'apporte rien au pouvoir inhibiteur. Les composés à fonction thiol d'abord jugés inhibiteurs, Barron et Singer [8], le sont en réalité assez peu, Takenaka et Schwert [117]. La fonction SH non ionisée intervient seulement dans la liaison au coenzyme.

Nous ne citons que pour mémoire les autres inhibiteurs qui ne sont pas des constituants de la réaction enzymatique ou de l'organisme humain.

Le bisulfite de sodium, inhibiteur important, paraît se combiner avec le substrat, Zelitch [156].

Le sulfite de sodium a une action moins constante. Inhibiteur de l'enzyme hépatique du rat il est sans action sur celle du cœur de bœuf ou du muscle de lapin, Terrayama et Vestling [118]. Ces inégalités dans l'action d'un inhibiteur montrent la diversité de structure des sites actifs de l'enzyme, ou de ses isoenzymes.

Les ions mercuriques et le p-chloro-mercuribenzoate, Neilands [72], inhibent les diverses lacticodéshydrogénases isolées. Ils bloquent les groupements SH qui sont donc indispensables à l'action enzymatique.

L'inactivation par les iodures qui oxydent les fonctions SH confirme le rôle de ces dernières dans l'action enzymatique, Dube, Roholt et Pressman [25].

La chaleur, Pfleiderer, Jeckel et Wieland [81], les agents dénaturants, l'urée à forte concentration inhibent l'action des lacticodéshydrogénases, Emerson et Wilkinson [26].

A côté de ces composés nous devons citer des inhibiteurs intéressants pour le travail que nous nous sommes proposé. Ce sont les solvants organiques, acétone et chloroforme en particulier.

Le chloroforme inhibe la lacticodéshydrogénase et plus fortement celle des hématies que celle du sérum, Warburton, Smith et Laing [138], Warburton et Smith [137].

L'acétone exerce aussi une action inhibitrice mais peu spécifique, elle est liée à la précipitation des protéines, Latner et Turner [58].

LES ISOENZYMES DES LACTICODESHYDROGENASES.

Les isoenzymes ou isozymes sont des protéines enzymatiques qui, catalisant la même réaction, ont une constitution voisine ou très voisine mais se laissent cependant séparer par certaines de leurs propriétés physico-chimiques, formes cristallines différentes, Tsao [124], Pesce et coll. [79], migration chromatographique et électrophorétique et par certains caractères immunologiques.

Elles paraissent provenir d'un contrôle génétique différent, deux gènes de structure étant impliqués dans leur synthèse, Vesell [129], Uriel [126].

La lacticodéshydrogénase a été la première enzyme reconnue hétérogène. Vesell et Bearn [130] d'une part, Wieland et Pfleiderer [143] d'autre part ont pu la fractionner par électrophorèse. De nombreux auteurs ont confirmé leurs travaux, Markert et Möller [64] en particulier.

L'existence de plusieurs formes isoenzymatiques de la lacticodéshydrogénase a été reconnue progressivement par une série de chercheurs. Meister [66] avait distingué en 1950 deux fractions dans la LDH du cœur de bœuf et Neilands [71] les avait reconnues, en 1952, également actives après leur séparation électrophorétique. En 1957, Vesell et Bearn [131] séparent du sérum humain par électrophorèse sur amidon trois fractions à action de lacticodéshydrogénase, Sayre et Hill [101] obtiennent un résultat comparable par électrophorèse sur papier. Wieland et Pfleiderer [142] trouvent quatre puis cinq fractions protéiques actives dans les divers organes. Ces résultats sont confirmés par divers procédés d'électrophorèse et d'immunoélectrophorèse, Nisselbaum et Bodansky [73]; ils montrent dans les organes de l'homme et des animaux supérieurs cinq isoenzymes à activité de lacticodéshydrogénase.

De nombreuses autres enzymes : malicodéshydrogénase, 6 phosphogluconatedéshydrogénase, déshydrogénase-isocitrique, transaminases, phosphatases, leucine-aminopeptidase, créatine-kinase, ribonucléase, furent ensuite reconnues formées de plusieurs isoenzymes, Wilkinson [150].

Le terme isoenzyme est recommandé par la Commission des Enzymes de l'Union internationale de Biochimie. Celui d'isozyme proposé par Markert et Möller en 1959 [64] est moins utilisé et doit être abandonné.

Caractères des diverses isoenzymes.

Les enzymes isolées de divers organes ont toutes la même action, la même spécificité de substrat, le même poids moléculaire, 135 000 environ (130 à 150 000 suivant le procédé de

détermination utilisé). Mais des différences existent cependant entre elles, solubilités, pH optimum, constante de MICHAELIS et MENTEN [69], nombre de molécules du substrat transformées par minute par une molécule d'enzyme.

La migration électrophorétique sur divers milieux et en particulier sur gel d'acrylamide, montre des différences nettes et laisse penser à une composition en acides aminés différente. LDH_1 a un caractère plus cathodique, elle migre plus vite et contient plus d'acides aspartique et glutamique, moins d'arginine et de lysine que LDH_5 qui a un caractère plus anodique.

Les cinq isoenzymes de la LDH sont constituées par l'association de quatre subunités, APPELLA et MARKERT [3]. Celles-ci sont de deux types et sont appelées H et S par WIELAND et PFLEIDERER [142], H et M par CAHN, KAPLAN, LEVINE et ZWILLING [15].

H signifie subunité de cœur, M celle de muscle. MARKERT [61] proposait de donner aux subunités les symboles A et B : il n'a pas été suivi.

Les cinq combinaisons possibles résultant de l'association de 4 subunités de type H et M peuvent être représentées comme suit, KAPLAN [51],

$$H_4 \quad H_3M \quad H_2M_2 \quad HM_3 \quad M_4 \text{ d'après CAHN [15]}$$

MARKERT [61] avait d'abord choisi les appellations A et B. Ce choix conduisait aux formes :

$$A_4 \quad A_3B \quad A_2B_2 \quad AB_3 \quad B_4$$

Les abréviations LDH_1, LDH_2, etc. ont aussi été adoptées par VESELL [129] et par d'autres auteurs utilisant la séparation électrophorétique. Les cinq isoenzymes sont alors,

$$LDH_1 \quad LDH_2 \quad LDH_3 \quad LDH_4 \quad LDH_5$$

Les lacticodéshydrogénases tétramères peuvent être dissociées en leurs quatre subunités par l'urée et la guanidine, APPELLA et MARKERT [3].

Le groupement de 4 subunités dans la molécule a été mis en évidence par diverses méthodes :

— Fixation du coenzyme, WINER et SCHWERT [152],

— Hybridation *in vitro*, MARKERT [61], CHILSON, CUTELLO et KAPLAN [17, 18],

— Réaction immunochimique, CAHN et coll. [15], MARKERT et APPELLA [63],

— Détermination du SH du site actif de chaque unité, FONDY et coll. [28],

— Détermination du poids moléculaire de M_4 et du nombre de ses subunités, Rossman, Jeffery, Main et Warren [100],

— Composition en acides aminés de chaque subunité, Wachsmuth, Pfleiderer et Wieland [134].

Nous ne nous arrêterons pas à ces diverses méthodes. Nous dirons seulement à propos de la composition en acides aminés de chaque subunité que la plus grande richesse en histidine de la forme M_4 des oiseaux, Pesce et coll. [78] a été confirmée par le taux assez important d'histidine dans la subunité M et nous signalerons que la méthode immunologique a donné les résultats les plus probants.

Les enzymes du cœur et du muscle sont distinctes au point de vue immunologique pour la fixation du complément. Les types M du lapin et du bœuf sont plus voisins immunologiquement que les formes M et H d'une même espèce, Pesce, Mac Kay, Stolzenbach, Cahn et Kaplan [79].

La répartition des isoenzymes de la LDH est très variable suivant les tissus.

Le muscle cardiaque contient plus de la moitié de ses LDH totales à l'état de H_4 ou LDH_1, Plagemann, Gregory et Wroblewski [83], Vesell et Bearn [131].

Le rein contient peu de LDH_1 et LDH_2 et des proportions à peu près identiques de LDH_3, LDH_4 et LDH_5, Wieme et van Maercke [149].

Le cerveau contient en quantités voisines les quatre formes, H_4, H_3M, H_2M_2 et HM_3, Lowenthal, van Sande et Karcher [59].

Le foie contient comme les muscles, une forte prédominance de LDH_5, Pfleiderer et Wachsmuth [82].

Les muscles squelettiques ont, soit une quasi-totalité de leur LDH sous forme de M_4, Plagemann, Gregory et Wroblewski [84], soit une large prédominance de cette forme à côté de M_3H et M_2H_2, Vesell et Bearn [131].

Les diverses isoenzymes de la LDH sont présentes dans le sérum normal en petites quantités. Elles sont inégalement réparties dans les diverses fractions protéiques et prédominent dans certaines d'entre-elles. Pruden, Creason et Block [85] ont montré que les fractions II (pré-β globulines et lipoprotéines) et III (γ-globulines) séparées par ultra-centrifugation contiennent 95 % de LDH sériques.

Pourcentage des isoenzymes de la LDH chez l'homme

PFLEIDERER et WACHSMUTH [82].

LDH	I	II	III	IV	V
Cœur	60	30	5	3	2
Hématies	36	35	9	0	0
Rein	28	34	21	11	10
Foie	0,2	0,8	1	4	94
Muscle	3	4	7,5	9,5	76
Epiderme	0	0	4	17	79

Les isoenzymes de la LDH, comme celles des autres enzymes, posent un certain nombre de problèmes,
d'origine,
de signification métabolique.

La présence dans le sang de certaines isoenzymes a en outre un intérêt de diagnostic en révélant la localisation tissulaire d'un processus pathologique, VALDIGUIÉ [127].

Origine.

La diversité des isoenzymes tient à l'intervention de deux gènes de structure différente dans la synthèse enzymatique, VESELL [129], MARKERT et URSPRUNG [65], MARKERT [61], URIEL [126]; nous l'avons déjà signalé.

Signification métabolique.

Elle nous intéresse car nous aurons à l'envisager pour l'interprétation des résultats de nos recherches. La diversité des isoenzymes de la lacticodéshydrogénase est en rapport avec le métabolisme des cellules qui les forment, DAWSON, GOODFRIEND et KAPLAN [20].

Le muscle cardiaque a un métabolisme principalement aérobie; il contient surtout la forme H_4 qui est inhibée par de faibles doses de pyruvate. Dès que celui-ci est formé dans le cœur il ne sera pas hydrogéné en lactate par la LDH_1 inhibée, mais métabolisé par le cycle citrique, URIEL [126].

Les muscles du squelette au contraire contiennent surtout la forme M_4, CAHN, KAPLAN, LEVINE et ZWILLING [15], KAPLAN et CAHN [52]. Ils sont destinés à la production d'acide lactique par un métabolisme anaérobie. Ils ont une prédominance de l'isoenzyme M_4, PFLEIDERER et WACHSMUTH [82], qui permet au maximum la lacticogenèse.

De même le rapport H_4/M_4 est plus haut dans le cerveau des rats âgés que dans celui des rats jeunes. Ce changement peut diminuer la capacité du tissu à tolérer des conditions anaérobies, KANUNGO et SINGH [50].

L'opposition entre les métabolismes aérobies et anaérobies liés aux deux formes M_4 et H_4 peut se retrouver dans un phénomène d'inhibition. L'isoenzyme M_4 est inhibé par un peptide trouvé dans l'urine humaine, appelé peptide I, tandis qu'un autre peptide urinaire, peptide II inhibe H_4, WACKER et SCHOENENBERGER [135].

Séparation des izoenzymes.

L'isolement et la caractérisation des isoenzymes de la LDH ont été permis par l'utilisation de leurs propriétés. Deux ont été de première importance :

— la migration électrophorétique,

— la chromatographie par échange d'ions.

1. ELECTROPHORESE.

La séparation grâce aux vitesses de migration inégales a pu être réalisée par les techniques multiples de l'électrophorèse, ROMAN [97].

Un isozymogramme est obtenu; il montre la présence de cinq bandes distinctes. Elles ont été identifiées par VESELL et BEARN [130].

Deux bandes ont une grande mobilité et sont les plus importantes. Elles sont les isoenzymes LDH_1 et LDH_2.

LDH_1 est la fraction la plus rapide. Elle est située entre l'albumine et les globulines α_1.

LDH_2 est dans la partie rapide des globulines α_1.

LDH_3 migre avec les globulines β, entre β_1 et β_2.

LDH_4 se place sur le front des globulines γ.

LDH_5 peu abondante se trouve sur la partie lente des globulines γ.

Appliqué au sang ou aux homogénats d'organes, le fractionnement électrophorétique a été obtenu en respectant les précautions habituelles pour éviter la dénaturation.

De nombreuses techniques ont été proposées; elles diffèrent surtout par le choix du support :

— Agar-agar, WIEME [147];

— Amidon, VESELL et BEARN [130];

— Papier seul ou imprégné de solutions diluées de sels ou de mélanges tampons, SAYRE et HILL [101];

— Acétate de cellulose, Wieland, Pfleiderer et Ortanderl [144];

— Gélose, Gordon, Keil et Sebesta [33];

— Gels d'acrylamide, Raymond et Weintraub [89].

a) *Electrophorèse sur papier.*

Sayre et Hill [101] l'ont appliquée avec un potentiel ne dépassant pas 10 V/cm pour éviter un échauffement causant la dénaturation.

b) *Electrophorèse sur papier en courant continu.*

Grassmann et Hannig [34], Block, Durrum et Zweig [11], Hobart et Rose [45] l'ont étudiée et mise au point.

Elle a l'avantage de pouvoir fournir des quantités assez importantes d'isoenzymes.

c) *Electrophorèse sur amidon.*

C'est ce procédé qui a permis la première séparation des isoenzymes de la LDH obtenue par Vesell et Bearn [130] et appliqué pour l'obtention de quantités plus grandes par Wilkinson, Cooke, Elliot et Plummer [151].

La préparation du bloc d'amidon imprégné de tampon et placé entre deux plaques de verre est assez délicate.

d) *Electrophorèse sur gel d'amidon.*

Smithies [110] l'a proposée et elle a été souvent utilisée en raison de la très grande résolution qu'elle réalise pour les fractions protéiques du plasma.

De nombreux auteurs l'ont mise en pratique pour la LDH du sang et des tissus, Markert et Möller [64].

La séparation des isoenzymes sériques est bonne à condition de respecter soigneusement les conditions expérimentales : Ressler et Joseph [92]. Ressler, Schulz et Joseph [93] ont montré par exemple que la diminution de la force ionique du tampon peut faire migrer LDH_5 vers l'anode et non plus vers la cathode.

e) *Electrophorèse sur acétate de cellulose.*

C'est une bonne technique proposée par Wieland, Pfleiderer et Ortanderl [144]. La migration est rapide et la séparation est bonne. Les membranes d'acétate de cellulose sont homogènes et facilement rendues transparentes, Barnett [7].

f) *Electrophorèse sur gélose.*

Appliquée aux protéines d'après les anciennes expériences d'Arrhenius par Gordon, Keil et Sebesta [33], elle a permis à Wieme [147] de séparer les isoenzymes de la LDH dans le sérum sanguin normal et pathologique.

g) *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.*

Les gels d'acrylamide proposés par Raymond et Weintraub [89] ont un pouvoir de résolution élevé et la lecture des bandes est facile à cause de la limpidité du gel. La séparation des isoenzymes sur ce support a été décrite par Raymond et Aurell [88], Fritz et Jacobson [30].

2. Chromatographie.

Les techniques chromatographiques ont surtout été utilisées sur les divers dérivés de la cellulose, carboxyméthylcellulose et diéthylaminoéthylcellulose (DEAE-cellulose) Sober et Peterson [111]. Hess et Walter [43] ont décrit un procédé sur DEAE-cellulose relativement simple.

Les sephadex et le DEAE-sephadex en particulier ont aussi été utilisés, Wieland et Determann [140], Richterich, Schafroth et Aebi [96].

DOSAGE

DES

LACTICODESHYDROGENASES

Dosage de la Lacticodeshydrogenase

Deux types de méthodes peuvent être utilisés :

1) Dosage colorimétrique,

2) Dosage par absorption ultra-violette.

1. DOSAGE COLORIMETRIQUE.

Ce type de dosage d'abord utilisé par WROBLEWSKI et LA DUE [153] en 1955 a été modifié et mis au point par CABAUD et WROBLEWSKI [14].

Méthode colorimétrique de CABAUD et WROBLEWSKI.

Elle consiste à faire agir la lacticodéshydrogénase sur un excès connu d'acide pyruvique. La quantité de cet acide transformée en acide lactique par l'enzyme en présence d'un excès de NADH est connue par différence entre l'acide pyruvique initial et l'acide pyruvique restant.

Les deux dosages de cet acide sont faits colorimétriquement après formation de 2-4 dinitrophénylhydrazone pyruvique.

Nous avons utilisé les réactifs B-D MERIEUX.

Ils comprennent 4 solutions.

Réactifs.

1) Solution de pyruvate de sodium tamponnée à pH 7,5 en présence de $CHCl_3$ comme conservateur.

2) Solution de NADH, 1 mg par flacon.

La réaction enzymatique sera faite dans le flacon lui-même.

3) Solution de 2-4 dinitrophénilhydrazine dans ClH.

4) Solution de NaOH 0,4 N.

Technique.

a) On place dans la solution de NADH (flacon n° 2) 1 ml de la solution pyruvique, réactif n° 1 et on porte 10 minutes au bain marie à 37°.

b) D'autre part 1 volume de sérum à doser (0,1 ml) est additionné de 5 volumes d'eau distillée (0,5 ml).

0,1 ml de cette dilution est ajouté dans le flacon n° 2. On main-

tient le flacon bouché par un bouchon de caoutchouc et on mélange bien par plusieurs retournements. Le flacon est à nouveau porté au bain marie à 37° pendant exactement 30 minutes.

c) 1 ml de la solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine (réactif n° 3) est ajouté immédiatement et on laisse 20 minutes à la température du laboratoire.

d) Après alcalinisation par 10 ml de soude 0,4 N, on maintient pendant 30 minutes à la température du laboratoire, la coloration se stabilise.

e) La densité optique est lue au photocolorimètre à la longueur d'onde de 340 mμ.

Courbe d'étalonnage.

Elle est faite en préparant six tubes avec des concentrations décroissantes d'acide pyruvique.

Tubes n°	Réactif n° 1 (pyruvate) ml	Eau distillée ml
1	1,0	0,1
2	0,8	0,3
3	0,6	0,5
4	0,4	0,7
5	0,2	0,9
6	0,1	1,0

On ajoute à chaque tube 1 ml de la solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine, après mélange on laisse 20 minutes à la température du laboratoire. L'addition de 10 ml de soude 0,4 N est suivie d'une nouvelle agitation pour bien mélanger et d'un nouveau repos de 30 minutes à la température du laboratoire.

La lecture colorimétrique est faite en prenant pour témoin un tube d'eau distillée. La longueur d'onde doit être comprise entre 300 et 550 mμ.

Nous avons choisi la longueur d'onde de 340 mμ. La quantité de LDH est directement lue sur la courbe d'étalonnage. Celle-ci est tracée sur papier semi-logarithmique en portant en ordonnée la D.O. (ou le pourcentage de transmission). Les résultats sont exprimés en unités définies par WROBLEWSKI et LA DUE [153], quantité d'enzyme contenue dans 1 ml de sérum produisant en 1 minute à 25° et à une longueur d'onde de 340 mμ une baisse de D.O. de 0,001.

Les mesures à 25° et à 37° donnent les mêmes résultats.

Si la lecture pour un essai donne plus de 2 000 unités WROBLEWSKI, on fait une nouvelle dilution au 1/5 de la dilution au 1/5 déjà faite.

2. DOSAGE PAR ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET.

Le principe de ce dosage repose sur l'absorption de la lumière ultra-violette par la forme réduite du coenzyme NADH. Cette absorption est maximum à 340 mμ. La forme oxydée du NAD ne montre pas d'absorption à cette longueur d'onde, WARBURG et CHRISTIAN [136].

Dans cette méthode l'activité enzymatique est déterminée non par la mesure du pyruvate disparu comme dans la méthode colorimétrique, mais par celle du NADH oxydé. Cette quantité est connue par la diminution de l'absorption à 340 mμ, le coefficient d'extinction est de 6, 2. 10^6 cm^2/mol, à cette longueur d'onde et à 25°.

Méthode et matériel.

On utilise une solution 0,00031 M de pyruvate dans un tampon phosphate 0,05 M de pH 7,5 et une solution de NADH 0,008 M dans le même tampon. Il est commode et simple d'employer des réactifs préparés. Nous avons choisi les réactifs BOEHRINGER.

Le spectrophotomètre utilisé est le « Calbiometer » qui donne la possibilité de suivre instantanément la disparition de NADH par lecture directe de la D.R. et qui est muni d'une circulation d'eau permettant d'opérer à température constante (25°C) pendant le dosage.

Technique.

On mélange :

3 ml de la solution de pyruvate,
0,05 ml de la solution de NADH,
0,1 ml de sérum non hémolysé.

La lecture de la densité optique est faite immédiatement en même temps que l'on déclenche un chronomètre. Puis on lit la D.O. toutes les minutes pendant 5 à 6 minutes.

On calcule alors la diminution moyenne de D.O. par minute (ΔE) et on en déduit l'activité enzymatique par des tables ou un calcul simple :

$$\Delta E/min \times 5050 = mU/ml$$

Note.

Le dosage des LDH sériques n'est valable que pour un sérum non hémolysé puisque les globules sont 160 fois plus riches que le plasma. KING [54].

Le dosage de la LDH enzyme fragile doit être fait dans les quatre heures suivant le prélèvement; sinon le plasma doit être congelé.

DOSAGE DES ISOENZYMES

Ce dosage peut être fait suivant plusieurs techniques. D'abord un fractionnement assez grossier mais rapide.

1. Instabilité à la chaleur.

La différence de stabilité thermique des isoenzymes de type foie M_4 et de type cœur H_4 permet de les séparer. KRIEG, GORTON et HENRY [56], ROMAN, OON, GAN et RUYS [98], WARBURTON et SMITH [137].

L'incubation du sérum à 65°C pendant 30 minutes détruit l'isoenzyme hépatique M_4.

Le dosage de la forme restante indique le taux de H_4 et la différence entre les LDH totales et ce taux de H_4 permet de connaître celui de M_4.

Un dosage comparable peut être fait par absorption sur DEAE-cellulose et un dosage plus précis par électrophorèse.

2. Adsorption sur DEAE-cellulose.

Elle assure une séparation que HESS et WALTER [44] ont jugé correcte.

L'adsorption des LDH sur la DEAE-cellulose est sélective. La forme M_4 n'est pas retenue alors que l'isoenzyme H_4 l'est fortement.

Le sérum mis au contact 10 minutes avec la DEAE-cellulose perd sa LDH cœur qui est adsorbée; la LDH hépatique reste en solution.

Technique.

Le sérum est dialysé 1 h 30 à 2 heures à la température du laboratoire contre un tampon phosphatique 0,02 M de pH 6,0.

L'activité lacticodéshydrogénasique du sérum dialysé ayant été dosée préalablement, on mélange 2 ml de sérum et 2 ml d'une suspension de DEAE-cellulose (5 g dans 50 ml de tampon phosphatique 0,02 M pH 6,0).

Après 10 minutes de contact et centrifugation le liquide ne contient que la LDH hépatique. La LDH cardiaque est retenue sur la DEAE-cellulose.

Le taux des deux enzymes peut être déterminée par différence.

L'élution de l'isoenzyme adsorbée peut aussi être faite. Elle est réalisée par un mélange de tampon phosphatique 0,2 M, pH 6,0 et de chlorure de sodium 0,2 M.

Les méthodes précédentes ont l'avantage d'une assez grande simplicité et de la rapidité, mais elles ne donnent qu'un fractionnement insuffisant.

La LDH de type cœur retenue par la DEAE-cellulose est le mélange des deux isoenzymes H_4 et H_3M ou LDH_1 et LDH_2 tandis que la LDH de type foie non retenue est en réalité formée des trois isoenzymes, H_2M_2, HM_3 et M_4 ou LDH_3, LDH_4 et LDH_5.

La séparation des cinq formes de la LDH, H_4, H_3M, H_2M_2, HM_3, M_4, ne peut être convenablement obtenue que par électrophorèse et c'est cette méthode qui est maintenant la seule utilisée pour la séparation et le dosage des isoenzymes.

ELECTROPHORESE DES ISOENZYMES.

Nous avons choisi et mis en pratique la méthode de WIEME [145, 146] modifiée par JORDAN et WHITE [49] que nous allons décrire brièvement.

Méthode de WIEME.

Elle emploie la gélose comme support : solution à 0,9 % dans un tampon véronal de pH 8,2 et de force ionique 0,05.

Le fractionnement est fait sur une lamelle porte-objet à basse température, + 4°. Le champ électrique est de l'ordre de 20 volts/cm. La préparation, d'une épaisseur de 1,5 mm, est refroidie par un mélange d'éther et d'éther de pétrole placé sous la lame. L'évaporation de ce mélange empêche l'élévation de température. On fait un dépôt de quelques microgrammes de sérum.

WIEME a proposé de suivre la migration par un artifice utilisant la différence de transparence aux rayons U.V. de NAD très perméable et de NADH très peu transparent. Il appelle sa technique « enzymo-électrophorèse ».

Pour suivre la technique décrite par cet auteur on place sur la plaque de gélose, après la séparation électrophorétique des isoenzymes une deuxième plaque fraîchement préparée sur laquelle ont été placés :

— le tampon véronal pH 8,2,

— le substrat pyruvate,

— le révélateur de l'activité enzymatique c'est-à-dire le NADH.

Immédiatement après leur superposition les deux plaques sont transférées dans un photomètre réglé à 340 mμ et on établit une ligne de base en déplaçant la préparation devant la source d'U.V.

Après deux minutes de contact, les produits ayant diffusé dans la gélose, on peut voir l'oxydation du NADH se produire là où il y a une isoenzyme et l'opacité de la plaque diminuer à cet endroit.

Dans la ligne de base vont apparaître des « creux » correspondant aux cinq isoenzymes.

Cette méthode permet de mesurer la cinétique de la réaction.

Au bout de dix minutes environ la réaction enzymatique est pratiquement terminée et la dernière courbe montre l'activité de chacune des cinq isoenzymes.

Cette mesure physique peut être remplacée par une méthode colorimétrique dans le visible utilisant les sels de tétrazolium proposés par MARKERT et MÖLLER [64], NACHLAS, MARGULIES, GOLDBERG et SELIGMAN [70], TSOU, CHENG, NACHLAS et SELIGMAN [125], DEWEY et CONKLIN [24].

Lorsque le lactate est oxydé en pyruvate par la LDH les électrons peuvent être transférés par le phénazine-méthosulfate (PMS) à un sel de tétrazolium, le nitro-bleu de tétrazolium (NBT), qui est transformé en un formazan rouge-violet.

La révélation est réalisée comme suit, immédiatement après la séparation électrophorétique.

Le colorant va être apporté par l'agar-agar recouvrant sur une épaisseur de 1 mm une lame identique à celle sur laquelle la migration a été faite. Pour obtenir la solution du colorant on place dans une série de tubes 2 ml d'une solution d'agar-agar à 1,2 % dans un tampon barbital (pH 8,4, force ionique 0,1) contenant du cyanure de sodium (molarité 0,01 M) et on ajoute dans l'ordre après liquéfaction au bain-marie,

0,15 ml de lactate de Na 0,1 M,

0,15 ml d'une solution de NAD à 1 % dans l'eau bidistillée,

0,15 ml d'une solution extemporanée de nitro-bleu de tétrazolium à 0,1 %,

0,04 ml de phénazine-méthosulfate à 0,1 %.

On verse le contenu d'un tube sur les plaques. Celles-ci sont ensuite placées gel contre gel sur les plaques potant les LDH séparées par l'électrophorèse. Le tout est mis dans un incubateur à 37° à l'obscurité pendant 60 à 120 minutes suivant la concentration des LDH.

Les zones où ont migré les isoenzymes sont colorées en rouge-pourpre. On fixe ensuite 2 heures dans l'alcool à 70 % contenant 5 % d'acide acétique et on mesure l'intensité des colorations par spectrophotométrie.

Une méthode un peu plus simple a pu être utilisée : c'est celle de van der Helm [40].

Après l'électrophorèse les lames de gélose sont incubées une heure dans le mélange,

Lactate de Na (M)	1,0 ml
NADH, solution à 10 mg par ml	1,0 ml
ClNa (0,1 M)	1,0 ml
Cl_2Mg (0,005 M)	1,0 ml
Tampon phosphate pH 7,4 (0,5 M)	2,5 ml
Nitro-bleu de tétrazolium (1 mg/ml)	2,5 ml
Phénazine-méthosulfate (1 mg/ml)	0,25 ml

Après incubation à l'obscurité la lame est rincée à l'eau, fixée comme ci-dessus par l'alcool acétique. L'intensité des taches est alors déterminée par spectrophotométrie.

Proportion des diverses isoenzymes des lacticodeshydrogénases dans le sérum normal

La proportion des diverses isoenzymes sériques de la lactico-déshydrogénase a été indiquée par plusieurs auteurs. Leurs résultats sont comparables avec cependant quelques divergences tenant à la méthode d'électrophorèse et à la technique de révélation.

Pour van der Helm, Zondac et Hartog [41], les valeurs moyennes sont :

LDH_1	31 - 54 %	moyenne	44,5 %
LDH_2	37 - 54 %	—	46,0 %
LDH_3	3 - 15 %	—	8,0 %
LDH_4	0 - 4 %	—	1,2 %
LDH_5	0 - 3 %	—	0,5 %

Wieme [145] propose un pourcentage un peu différent :

LDH_1	23,2 %
LDH_2	47,5 %
LDH_3	18,5 %
LDH_4	7,5 %
LDH_5	3,2 %

Cohen et Djordjevich [19] qui ont comparé les valeurs obtenues par électrophorèse sur amidon et sur agar-agar avec des méthodes de révélation différentes donnent les résultats groupés dans le tableau suivant :

Technique		Pourcentage				
Electrophorèse	*Révélation*	LDH_1	LDH_2	LDH_3	LDH_4	LDH_5
Gel d'amidon	spectrophot.	34,0	47,0	19,0	—	—
Gel d'amidon	spectrophot.	22,5	37,5	17,5	7,5	2,5
agar	U.V.	23,2	47,5	18,5	7,5	3,2
agar	U.V.	24,1	28,0	24,4	11,3	12,2
agar	N.B.T.	44,5	46,0	8,0	1	0,5
agar	N.B.T.	33,0	47,0	14,0	6	0,5

Biserte, Farriaux, Hoste, Guinamard et Fontaine [10] ont trouvé chez l'enfant les valeurs indiquées ci-dessous :

LDH_1	29,2 %
LDH_2	41,0 %
LDH_3	24,5 %
LDH_4	3,8 %
LDH_5	2,1 %

Valeurs normales de la lacticodeshydrogénase sérique

Les méthodes de dosage que nous venons d'exposer ont permis de connaître les valeurs physiologiques de la LDH dans le sang.

Le taux sérique de celle-ci a été diversement exprimée car plusieurs unités ont été choisies par certains auteurs.

Ce sont :

— l'unité internationale,
— l'unité SCHWARZ et BODANSKY,
— l'unité WROBELWSKI,
— l'unité KORNBERG,
— l'unité RACKER,
— l'unité BÜCHER.

Unité internationale

Elle est la plus importante. Cette unité officielle utilise le changement d'absorption à 340 mμ lié à la conversion :

$$NADH \rightarrow NAD$$

Elle est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromolécule de substrat par minute à la température de 25° et dans les conditions optimales de pH et de concentration du substrat, THOMPSON [21]. Rapport de la Commission des Enzymes, 1961 [91].

Elle est rapportée à 1 millilitre de sérum. μ moles/min/ml.

Pour ne pas utiliser en clinique des nombres trop petits, on choisit une unité se rapportant au litre et on appelle Unité Internationale cette nouvelle unité,

$$U.I. = \mu \text{ moles/min/litre}$$

Elle correspond à la transformation de 458 μ moles par minute et par litre.

L'unité rapportée au ml est alors appelée milliunité,

$$\text{milli U.I.} = \mu \text{ moles/min/ml}$$

Unité Schwarz et Bodansky (108)

Elle représente 1000 fois le changement d'absorption produit par 0,5 ml d'une dilution au 1/10 de sérum porté à un volume réactionnel final de 3 ml soit 0,0167 ml de sérum.

Cette unité peut être convertie en U.I. en multipliant par 0,16.

Unité Wroblewski (153)

C'est la quantité d'enzyme contenue dans 1 ml de sérum capable de produire à 25° en une minute et à une longueur d'onde de 340 mμ une baisse de la Densité Optique de 0,001. Cela dans les conditions expérimentales les meilleures pour l'action de la LDH, WROBLEWSKI et LADUE [153].

Signalons ici que la variation de 0,100 de Densité Optique à une longueur d'onde de 340 mμ correspond à 0,0161 μMole de NADH/ml.

Unité Kornberg (55) et *unité Racker* (86)

L'unité enzymatique est la quantité d'enzyme qui oxyde 1 micromole de NADH par minute.

Cette unité équivaut à 2073 U. Wroblewski.

Unité Bücher (9)

C'est la quantité d'enzyme qui a 25° et à 366 mμ provoque en 100 secondes un abaissement de l'absorption de NADPH de 0,1.

Cette unité correspond à 0,030 μ mole/ml.

Elle équivaut à 37,7 Unités Wroblewski.

TAUX NORMAUX DE LA LDH PLASMATIQUE

Les valeurs obtenues chez les sujets normaux par les méthodes que nous venons de citer sont les suivantes :

Valeurs limites normales Unités	*Moyennes Unités*	*Références*
260 à 850	470 ± 130	WROBLEWSKI (153)
200 à 500		CABAUD et WROBLEWSKI (14)
2,0 à 7,0 U. Bücher	3,16	SCHMIDT, SCHMIDT et WILDHIRT (104)
100 à 250 U.I. (μmole/min/litre) ou mU.I. (μmole/min/ml)		RAPP et BELL 187)
Chez l'enfant :		
180 à 280 U. Wroblewski.	276 ± 24	SCHAPIRA et DREYFUS (102)
100 à 300 mU.I.	197 ± 8,46	BISERTE, FARRIAUX, HOSTE, GUINAMARD et FONTAINE (10)

Les valeurs normales indiquées par BOEHRINGER pour leurs réactifs servant à la détermination de la LDH par absorption U.V. sont inférieures à 195 milliUnités Internationales par ml de sérum.

Les hématies sont beaucoup plus riches en LDH. KING [54] donne un taux de 58 000 unités globulaires pour 360 unités plasmatiques soit un rapport de 160.

LES VARIATIONS DES LACTICODESHYDROGENASES AU COURS DES ANESTHESIES

Travaux antérieurs

Depuis plus de trente ans le problème des variations des enzymes sériques au cours des diverses narcoses avait provoqué quelques recherches.

Thelen [119] le premier avait signalé en 1935 l'accroissement des enzymes du sérum après anesthésie à l'éther et au chloroforme alors que la narcose barbiturique n'amenait aucune variation.

Vingt ans se passent sans que de nouvelles recherches étudient cette variation. En 1957 par contre plusieurs travaux d'auteurs allemands, Hauss et Leppelmann [38] d'une part, Kern, Lo, Flux, Schimmelpfennig et Billmann [53] d'autre part confirment les résultats de Thelen.

Hauss note en outre que les changements des taux sériques de la lacticodéshydrogénase, de l'aldolase, de la tributyrinase et de la choline-estérase ne dépendent ni de la nature de l'intervention chirurgicale ni de celle de la narcose; ces auteurs ont expérimenté l'éther, le protoxyde d'azote et l'anesthésie locale.

Mais les résultats signalés dans d'autres recherches ne sont pas concordants.

Brechner, Watanabe et Dornette [12] étudiant la TGO sérique trouvent une augmentation plus forte au cours des anesthésies par le fluoromar et le protoxyde d'azote que lors des anesthésies avec NO seul ou lors des anesthésies rachidiennes.

Aucune variation des TGO et TGP n'est rencontrée par Virtue et ses collaborateurs [133] pendant la narcose au fluothane.

Stark et Claude [114] affirment que diverses narcoses sont sans influence sur TGO, TGP, LDH et MDH tandis que d'autres ne donnent qu'une variation tardive des trois premières enzymes. Comme les interventions chirurgicales graves leur ont donné les mêmes résultats, ils ne croient pas à l'influence de l'anesthésique sur les taux enzymatiques du plasma.

Schramm et Rudorf [107] confirment encore les résultats négatifs précédents; ils ne trouvent aucun changement de la LDH et aussi de la créatine-phosphokinase et des deux transaminases glutamo-oxalo-acétique et glutamo-pyruvique après des narcoses obtenues avec divers anesthésiques. Ils pensent que seule une déficience ou une lésion, soit hépatique soit cardiaque, peut causer l'augmentation des enzymes du plasma au cours de la narcose. Dans ces cas de perturbations tissulaires, l'influence de l'anesthésie sur les enzymes du sang ne serait pas discutable.

Scholler, Köhnlein et Carsjen [106] au contraire avaient observé une influence de divers narcotiques sur l'activité enzymatique du plasma. Dans leurs essais ils jugent liée à l'anesthésie une faible augmentation de la TGO et de la TGP et ils reconnaissent que ces variations auraient été considérées par d'autres auteurs comme des oscillations physiologiques des valeurs normales.

Le problème essentiel qui nous intéresse, l'influence de l'anesthésie sur la lacticodéshydrogénase du plasma sanguin, a été envisagé par Schmidt, Fichler, Hammer et Gabsch [103] dans un article paru au cours de notre travail.

En vue d'orienter leurs recherches sur le traitement des carcinomes, ces auteurs ont expérimenté sur 4 groupes de 20 lapins :

— 1 groupe témoin,

— 1 groupe subissant une narcose à l'éther,

— 1 troisième recevant un barbiturate injecté dans la veine jugulaire,

— le quatrième groupe étant anesthésié par inhalation de fluothane.

Les enzymes étudiées ont été : cholinestérase, estérases non spécifiques, TGP, TGO, lipase, LDH, aldolase.

Le taux de ces enzymes était déterminé avant le début de la narcose, après 1 heure d'anesthésie, puis 4 heures après la fin de la narcose.

L'enzyme qui nous intéresse, la LDH, était dosée par mesure dans l'U.V. comme les TGO et TGP.

Les résultats sont divers : alors que la TGO, la TGP et la lipase ne subissent aucune variation significative au cours des trois types d'anesthésie, la cholinestérase s'abaisse légèrement pendant la première heure lors des anesthésies à l'éther. Elle s'abaisse aussi après 4 heures d'anesthésie barbiturique et s'accroît légèrement sous l'influence du fluothane, les estérases non spécifiques subissent aussi quelques variations difficiles à interpréter.

Pour ce qui est de la lacticodéshydrogénase, elle s'accroît dans le plasma lors des anesthésies à l'éther surtout après la première heure.

Les deux autres types d'anesthésie (barbiturique et halothan) n'ont pas la même influence et provoquent une variation très faible, soit en plus soit en moins.

Nous terminerons ce bref rappel des publications antérieures en citant les recherches expérimentales, voisines des nôtres, réalisées par Valdiguie, Lareng et Fourcade [128]. Ces auteurs ont suivi les variations de la LDH au cours des divers types d'intoxications chez le lapin. Ils ont mis en évidence une élévation notable de l'enzyme dans tous les cas d'intoxication étudiés, éther et barbituriques en particulier.

Travaux personnels

L'étude des travaux que nous venons de rapporter ne permet pas de résoudre définitivement le problème de l'influence de l'anesthésie sur les enzymes sériques et sur la LDH en particulier.

Plusieurs auteurs ont trouvé une augmentation que certains autres nient ou rapportent à des oscillations physiologiques.

Seuls, SCHMIDT, FICHLER, HAMMER et GABSCH [103] sont affirmatifs et définissent une augmentation de la LDH après la seule anesthésie à l'éther.

Lors de la parution de l'article de ces auteurs, nous avions déjà envisagé comme eux ce problème encore mal résolu et nous avons recherché le devenir de la LDH sérique après anesthésie au moyen de deux types d'anesthésiques les plus couramment employés, un barbiturique et l'éther.

MÉTHODES ET TECHNIQUES

Nous indiquerons seulement les techniques analytiques que nous avons employées parmi celles précédemment décrites.

1. Dosage U.V. des lacticodéshydrogénases totales, méthode CABAUD et WROBLEWSKI [14].

2. Séparation et dosage des isoenzymes, par la chaleur, par absorption sur DEAE-cellulose, par électrophorèse.

Nour rappelons que tout sérum hémolysé a été rejeté puisque les hématies contiennent beaucoup plus de LDH que le sérum et que l'hémolyse même faible enlève toute valeur au dosage des LDH sériques.

Nous devons aussi signaler que la LDH est une enzyme fragile. Son dosage doit être réalisé dans les quatre heures qui suivent le prélèvement, RICHTERICH [95].

Comme nous venons de l'indiquer l'anesthésique employé chez les sujets étudiés était Pentothal suivi d'Ether éventuellement chez les adultes, Pentothal Curare et Ether.

Les conditions de prémédication sont indiquées page 51.

Nos recherches ont comporté deux séries d'expériences et de dosages :

I. Recherches cliniques chez l'homme.

II. Recherches expérimentales chez le chien.

1) Recherches cliniques

Elles ont porté sur une série de 58 malades devant subir une intervention chirurgicale de nature et d'importance variables. Ne pouvant soumettre des malades à une anesthésie générale sans raison utile pour eux, il fallait, pour pouvoir interpréter valablement nos résultats analytiques, nous placer dans des conditions telles que seule l'anesthésie soit le paramètre fixe et constant, l'intervention étant un paramètre variable. Il fallait en outre éviter des variations post-anesthésiques de la LDH qui auraient pu dépendre d'une réaction hépatique.

Afin de supprimer ou atténuer cette cause d'erreur, nous avons choisi, pour servir à notre étude, des sujets adultes jeunes, ou des enfants du Service de Chirurgie infantile.

Nous avons dans tous les cas fait deux prélèvements sanguins :

Prélèvement initial de contrôle,

Prélèvement en cours d'anesthésie ou en cours de préparation à l'anesthésie.

Nous remercions le Professeur Maurice PASQUIÉ et ses assistants des facilités qu'ils nous ont données pour nos prélèvements.

Nos remerciements s'adressent également au Professeur LARENG et à son équipe d'anesthésistes, au Docteur Jacques VALDIGUIÉ et à M. Jean VALDIGUIÉ qui nous ont permis d'obtenir des échantillons sanguins prélevés dans les conditions et dans les délais les meilleurs.

PREMIERE SERIE DE RECHERCHES

ACTION DE L'ANESTHESIE SUR LA LDH TOTALE.

Après la prise de sang initiale précédant le début de l'anesthésie et la prémédication, nous avons effectué le second prélèvement une heure après le début de l'anesthésie quelle qu'ai été l'intervention et sa durée. Il s'agissait dans tous les cas d'intervention bénigne et de peu de durée, cure de hernie ou appendicectomie.

LDH mU.I./ml	*Avant*	*Après*	*Variations*
LAF	320	330	+ 3,1
RAF	150	400	+ 16,6
NIL	108	197	+ 82,2
LEB	244	256	+ 4,9
GOM	142	125	— 11,9
OLI	60	108	+ 80,0
COU	125	152	+ 21,6
TEN	160	211	+ 31,8
BER	218	319	+ 46,3
BAN	106	183	+ 72,6
CAS	222	303	+ 36,4
BER	168	271	+ 61,3
NUM	212	247	+ 16,5
ROB	62	100	+ 61,2
OUL	107	113	+ 5,6
DOU	111	291	+ 16,2
MAY	231	467	+ 102,1
PON	186	214	+ 15,0
DAL	154	171	+ 9,9
COM	270	310	+ 14,8
GAN	121	180	+ 48,7
SOU	166	196	+ 18,0
MEI	227	182	— 19,8
JOV	226	226	0
BOU	158	200	+ 26,5
BOY	267	300	+ 12,3
BAL	200	270	+ 35,0
ROD	227	230	+ 1,3
ALL	205	290	+ 41,4
BAR	290	320	+ 10,3
BON	245	275	+ 12,2
GUI	370	410	+ 10,8
ADA	238	370	+ 55,4
GAN	270	240	— 12,5
BRA	280	290	+ 3,5
FAN	284	340	+ 19,7
GOU	385	500	+ 29,8
RUL	246	300	+ 21,9
PER	88	110	+ 25,0
BOU	180	236	+ 31,1
BOR	500	480	— 4,0
GIL	250	290	+ 16,0
FLI	158	200	+ 26,5

LDH mU.I./ml	*Avant*	*Après*	*Variations*
POR	390	423	+ 8,4
FAL	195	220	+ 12,8
AMI	195	195	0
CAS	220	220	0
ARM	260	315	+ 21,1
ARN	287	404	+ 40,7
SEN	187	220	+ 17,6
WER	158	246	+ 55,6
COH	152	178	+ 17,1
WEI	132	225	+ 70,4
SEV	230	150	— 34,7
SER	217	170	— 21,1
PEY	120	120	0
VAL	105	150	+ 42,8
REC	250	360	+ 44,0

INTERPRETATION DES RESULTATS

Les valeurs moyennes des taux de LDH dans les sérums témoins et dans les sérums prélevés au cours de l'anesthésie pour des interventions chirurgicales bénignes sont respectivement de 207 et 255 mU.I.

L'écart type est de 5,8.

L'accroissement moyen des LDH de 48 mU.I. correspond à une élévation de 30,7 %.

L'augmentation observée est variable. Elle est décelable dans la majorité des observation, 48 sur 58.

Elle est le plus souvent comprise entre 20 et 50 %, 21 cas sur 48.

Elle peut parfois dépasser 50 % mais peu souvent, 6 cas sur 48.

Les limites supérieures sont de 102, 82 et 80 % dans un très petit nombre de cas.

Les faibles variations inférieures à 20 % ont été notées dans 14 cas.

Dans un petit nombre de cas, 4 sur 48, le taux de la lacticodéshydrogénase plasmatique reste inchangé.

Il s'abaisse dans 6 observations sur 48, soit dans 12,5 pour cent des cas envisagés.

Nous discuterons dans les conclusions générales la signification que l'on peut donner à nos résultats.

DEUXIÈME SÉRIE DE RECHERCHES

ACTION DE LA PREMEDICATION SEULE SUR LA LDH.

Pour préciser la part respective des médicaments servant à la préparation opératoire et de l'anesthésique lui-même, nous avons étudié chez 12 sujets, l'action de la prémédication sur la LDH sérique.

Le premier prélèvement ayant été fait le matin (après l'absorption de certains sédatifs la veille au soir), la seconde prise de sang a été pratiquée une heure après la prémédication, avant le début de l'anesthésie.

Les médicaments et les doses utilisés suivant l'âge sont indiqués dans le tableau suivant :

Age	Poids	Médication donnée	
		La veille au soir	*1 h 30 avant l'intervention*
8 à 10 ans	25 à 30 kg	Gardénal : 5 cg Phénergan sirop : 2 cuil. à café	Dolosal : 1 ml Phénergan : 1 ml Atropine : 1/4 mg
10 à 12 ans	30 à 36 kg	Gardénal : 5 cg Phénergan sirop : 3 cuil. à café	Dolosal : 1 ml Phénergan : 1,5 ml Atropine : 1/4 mg
12 à 14 ans	36 à 40 kg	Gardénal : 5 cg Phénergan : 1 comprimé	Dolosal : 1,5 ml Phénergan : 1,5 ml Atropine : 1/4 mg
14 à 16 ans	40 kg	Gardénal : 10 cg Phénergan : 1 comprimé	Dolosal : 2 ml Phénergan : 2 ml Atropine : 1/4 mg
Adulte		Phénergan : 1 comp. Valium : 1 comp. Equanil : 1 comp. ou tout anxiolytique	Dolosal : 2 ml Phénergan : 2 ml Atropine : 1/4 à 1/2 mg

VALEUR DE LA LDH SERIQUE

	Avant prémédication	*Après prémédication*	*Variation %*
GOR	103	176	+ 70,8
BON	122	180	+ 47,5
BUL	106	112	+ 5,6
NEI	225	180	— 20,0
BAR	168	251	+ 49,4
COR	210	291	+ 38,0
COT	212	282	+ 33,0
PER	219	286	+ 30,0
DEV	213	255	+ 19,2
MAD	202	237	+ 17,3
MIS	200	220	+ 10,0
LEU	300	380	+ 26,6
LAF	328	328	0
DOD	259	273	+ 5,4
GIR	206	178	— 13,5
POU	152	172	+ 13,1
PER	242	263	+ 8,6
PRU	223	259	+ 16,1

Ces dosages montrent que la variation de la LDH plasmatique commence avec la prémédication.

Sur les 18 cas que nous avons étudiés nous décelons 15 accroissements et 2 abaissements, un cas restant inchangé.

L'augmentation moyenne est d'après les quinze observations de 26,0 pour cent.

Elle est inférieure à celle que nous obtenons au cours de l'anesthésie. Elle montre cependant que l'accroissement de la LDH plasmatique débute sous l'influence de la prémédication.

TROISIÈME SÉRIE DE RECHERCHES

ETUDES DES VARIATIONS DES ISOENZYMES

L'augmentation habituelle de la lacticodéshydrogénase plasmatique au cours des anesthésies nous a conduit à envisager un nouvelau problème.

L'augmentation des isoenzymes est-elle globale et uniforme ou certaines d'entr'elles seulement sont-elles responsables de la variation observée.

Deux séries de recherches nous ont permis d'envisager ce problème :

L'absorption sur DEAE-cellulose,

L'électrophorèse.

Nous avons utilisé la différence de thermostabilité dans un seul cas.

Thermostabilité

Nous avons dosé la LDH du sérum étudié sur trois échantillons différents :

— l'un étant resté à la température du laboratoire,

— un second ayant été porté dix minute à 57°,

— le troisième à 65° pendant le même temps.

RESULTATS

LDH	*Totale*	*Thermostable cœur*		*Thermolabile foie*		*Intermédiaire*	
	U	U	%	U	%	U	%
Avant prémédication	584	95	16,2	350	59,9	139	19,2
1 h. après prémédication	717	95	13,2	483	67,3	138	23,8

Les variations observées sont une augmentation de la LDH totale passant de 584 à 717 unités soit 22,7 % en plus, et de la LDH hépatique thermolabile dont le taux passe de 350 à 483 unités soit 38 % d'accroissement.

Absorption sur DEAE-cellulose

Nous avons appliqué la méthode de Hess et Walter [43] et nous avons ainsi retenu la LDH de type cœur qui est formé de deux isoenzymes H_4 et H_3M ou $LDH_1 + LDH_2$, les LDH de type hépatique LDH_3, LDH_4, LDH_5, restant en solution.

RÉSULTATS

	LDH Type hépatique %			*LDH Type cœur %*		
	Avant	Après	Variation en +	Avant	Après	Variation en +
LAC	17,5	16,6	—	82,5	83,4	+ 0,9
GOM	10,6	14,4	+ 3,8	89,4	85,6	—
COU	36,0	35,0	—	64,0	65,0	+ 1,0
BER	32,8	26,4	—	67,2	73,6	+ 6,4
BAN	42,8	49,6	+ 6,8	57,2	50,4	—
CAS	45,0	40,0	—	55,0	60,0	+ 5,0
BER	59,7	48,0	—	40,3	52,0	+ 11,7
MIM	29,8	33,7	+ 3,9	70,2	66,3	—
DON	38,6	46,0	+ 7,4	61,4	54,0	—
MAY	35,1	32,1	—	64,9	67,5	+ 3,0
PON	33,9	41,3	+ 7,4	66,1	58,7	—
DAL	48,6	42,9	—	51,4	57,1	+ 5,7
COM	27,7	35,3	+ 7,6	72,3	64,7	—
GAR	38,4	25,8	—	61,6	74,2	+ 12,6
SOU	41,7	35,2	—	59,3	64,8	+ 6,5
MEI	38,9	49,0	+ 10,0	61,1	51,0	—
JOV	22,2	17,2	—	77,8	82,8	+ 5,0

Les résultats obtenus par cette technique sont variables. Cette variabilité peut tenir au fait que l'adsorption sur la DEAE-cellulose est peu spécifique. Elle porte sur deux isoenzymes alors qu'elle en laisse trois parmi lesquels deux contiennent une certaine quantité de la subunité H adsorbable.

Ces résultats montrent l'augmentation des isoenzymes à prédominance de subunité M dans cinq cas et l'accroissement des isoenzymes à subunité H dans dix cas.

Les valeurs moyennes de l'augmentation sont respectivement de 5,7 pour les LDH_1 et LDH_2 et de 6,1 pour les LDH hépatiques, LDH_3, LDH_4 et LDH_5.

Ces résultats sont donc peu probants et ne peuvent être retenus.

Leur variabilité peut tenir au fait que l'adsorption sur la DEAE-cellulose n'est pas spécifique. Elle porte sur deux enzymes et en laisse trois. Mais dans les isoenzymes retenus la subunité non adsorbable M est présente avec H_3M et l'unité H adsorbable se trouve dans la fraction hépatique, H_2M_2, HM_3.

Il fallait donc recourir à une méthode plus sépécifique, l'électrophorèse.

Electrophorèse des isoenzymes de la DLH

Nous avons employé la méthode de WIEME [145, 146] légèrement modifiée par JORDAN et WHITE [49] dont nous avons donné la technique.

Après migration la coloration a été réalisée soit par la méthode de WIEME [145] soit par celle de van der HELM [40].

Nous donnons ci-après la reproduction de plusieurs plaques d'électrophorèse et les courbes d'intégration correspondantes.

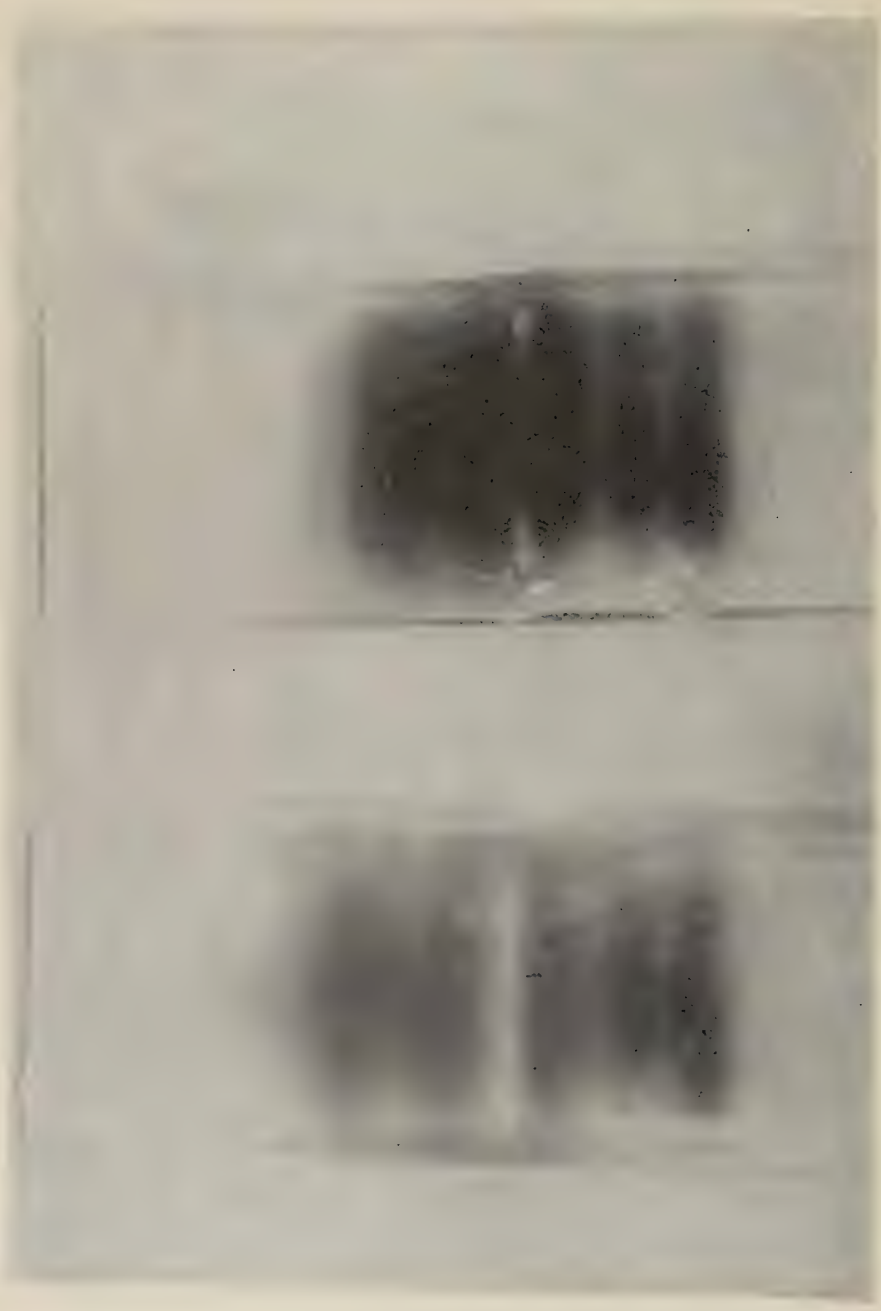
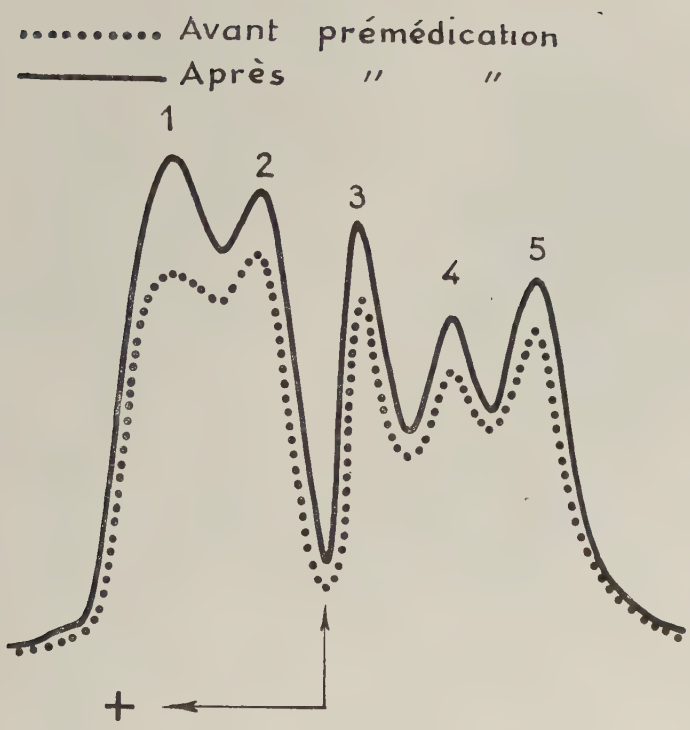


FIG. 1. — Migration électrophorétique
Révélation par le nitro-bleu de tétrazolium (NBT)
et courbe d'intégration correspondante


Avant prémédication
Après " "
1
2
3
4
5
+

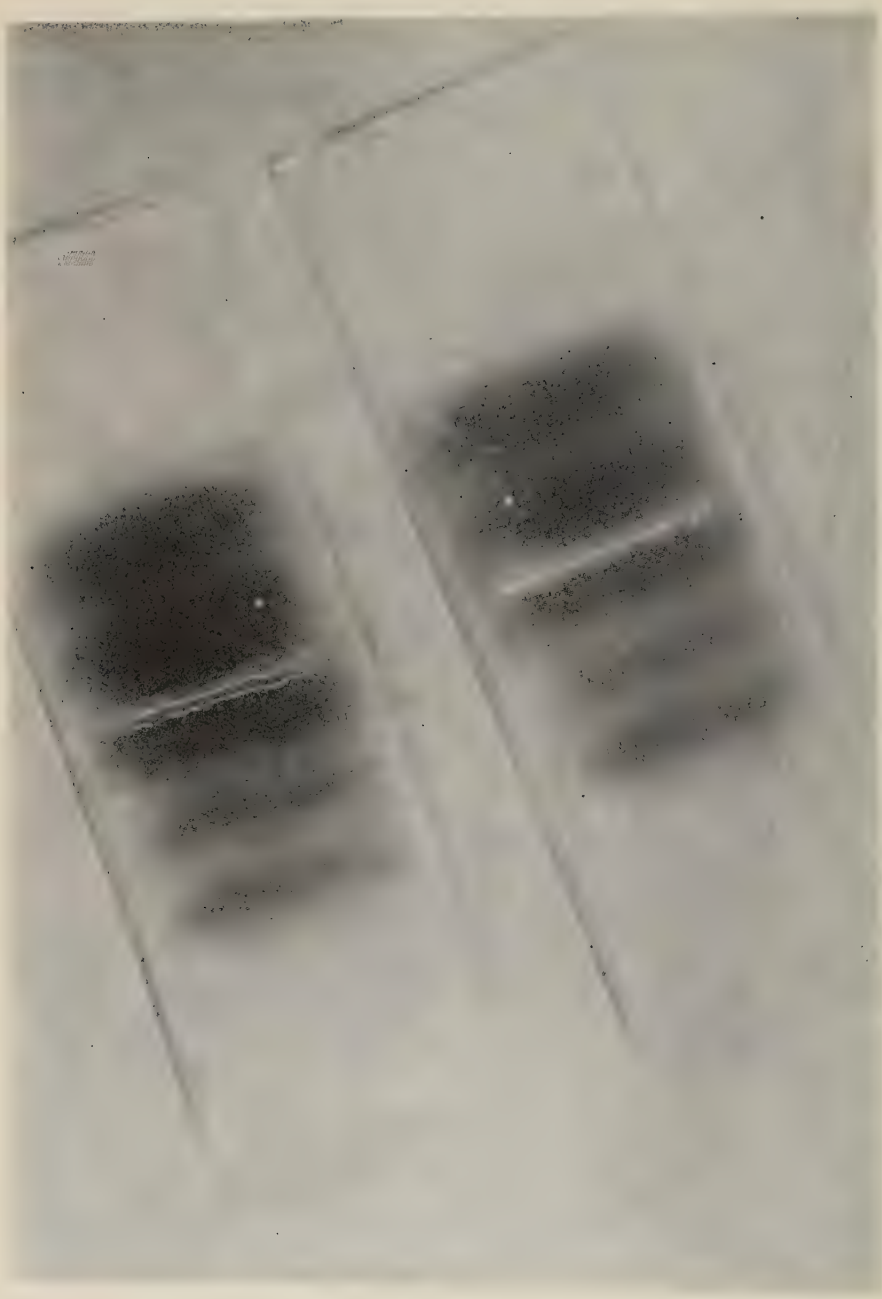


FIG. 2. — Migration électrophorétique
Révélation NBT et courbe d'intégration correspondante

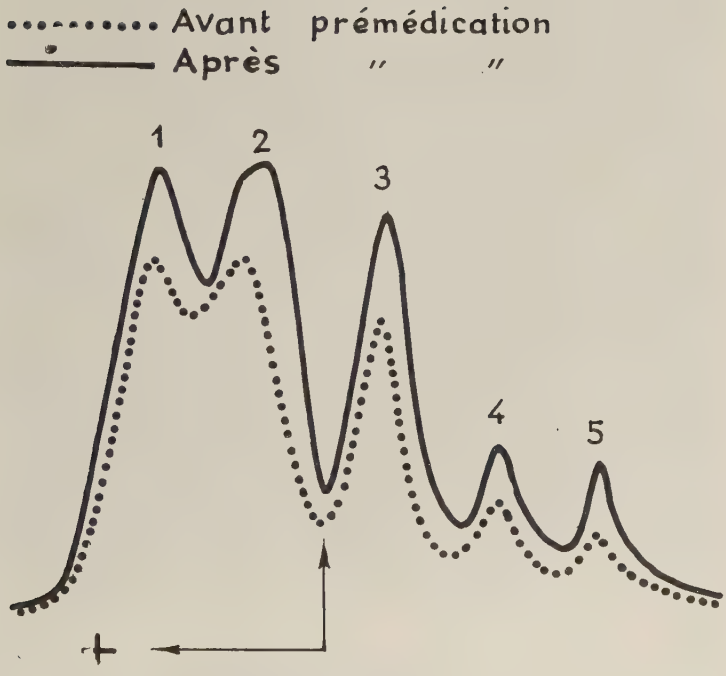

Avant prémédication
Après " "
1
2
3
4
5

FIG. 3. — Migration électrophorétique
Révélation par NBT et courbe d'intégration correspondante

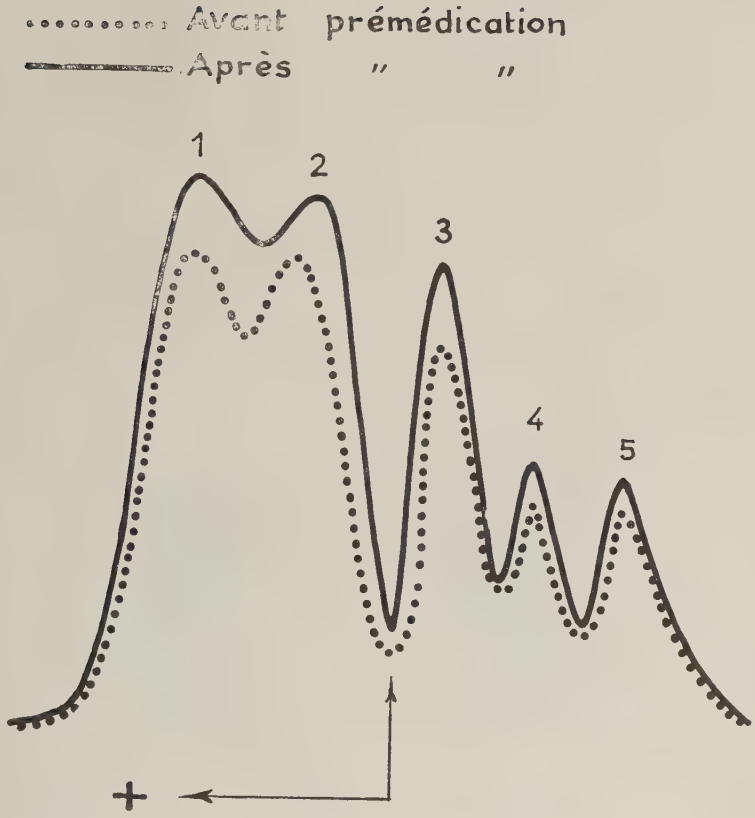
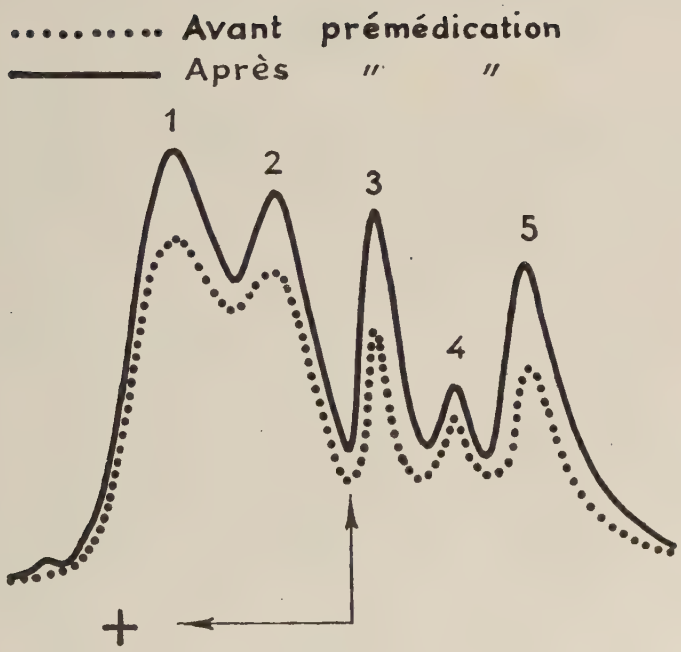

Avant prémédication
Après " "
1
2
3
4
5
+

FIG. 4 — Migration électrophorétique
Révélation par NBT et courbe d'intégration correspondante.


..... Avant prémédication
——— Après " "
1
2
3
4
5
+

Ces diverses courbes et tracés montrent qu'il n'y a pas de variation privilégiée de l'une des isoenzymes de la LDH au cours de l'anesthésie.

Il y a bien quelques petites différences entre les hauteurs des divers pics mais en fait la variation des isoenzymes provoquée par la prémédication ou l'anesthésie est globale.

2) Recherches expérimentales

Expérimentation sur le chien

Une seconde partie de nos recherches a porté sur le chien. Toute intervention chirurgicale était alors exclue, les animaux étant seulement anesthésiés. Nous avons fait dans nos expériences une prise de sang avant le début de l'anesthésie et de nombreux prélèvements à des intervalles de temps variables pendant la période de sommeil.

Plusieurs anesthésiques ont été étudiés :

Chloralose (8 cg/kg)

Nembutal (30-35 mg/kg)

Phénergan-Largactil (50 mg de chacun d'eux, voie I.M.)

Uréthane (1 g/kg de poids)

Ether.

Résultats :

Anesthésie à la chloralose

	LDH milliU/ml	*variations %*
CHIEN 1		
Avant anesthésie	95	
Après 1 heure	175	+ 84,2 %
— 2 heures	180	+ 89,4 %
— 3 heures	180	+ 89,4 %
— 24 heures	95	0
CHIEN 2		
Avant anesthésie	100	
Après 1 heure	130	+ 30 %
— 2 heures	115	+ 15 %
— 3 heures	120	+ 20 %
— 24 heures	94	— 6 %

Anesthésie au Nembutal

CHIEN 3		
Avant anesthésie	100	
Après 1 heure	230	+ 130 %
— 2 heures	320	+ 220 %
— 24 heures	90	— 10 %

Nous remercions très vivement le Professeur MONTASTRUC qui a permis et dirigé notre expérimentation dans son Service.

CHIEN 4

Avant anesthésie	90	
Après 1 heure	146	+ 62,2 %
— 2 heures	300	+ 233,3 %
— 24 heures	100	+ 11,1 %

CHIEN 6

Avant anesthésie	207	
Après 1 heure	260	+ 25,6 %
— 2 heures	300	+ 44,9 %

Anesthésie à l'Uréthane

(1 g/ g dans 10 ml de sérum physiologique)

CHIEN 7

Avant anesthésie	240	
Après 1 heure	350	+ 45,8 %
— 2 heures	245	+ 2,1 %

(1 g/kg dans 10 ml de sérum physiologique)

CHIEN 8

Avant anesthésie	260	
Après 1 heure	440	+ 69,2 %
— 2 heures	400	+ 53,8 %

Anesthésie à l'Ether

CHIEN 9

Avant anesthésie	105	
Après 1 h 30	176	+ 67,7 %
— 2 heures	216	+ 105,7 %

CHIEN 10

Avant anesthésie	100	
Après 1 h 30	160	+ 60,0 %
— 2 heures	130	+ 30,0 %

Prémédication : Phénergan-Largactil :

CHIEN 5

Avant anesthésie	100	
Après 1/2 heure	150	+ 50,0 %
— 2 heures	110	+ 10,0 %
— 24 heures	98	— 2,0 %

INTERPRETATION DES RESULTATS

Tous nos essais montrent une augmentation de la LDH plasmatique au cours de l'anesthésie du chien. Cette augmentation est notable dès la première heure avec tous les anesthésiques utilisés et elle est plus marquée en général au bout de deux heures d'anesthésie.

La moyenne des élévations obtenues est de 62,4 % pour la première heure, de 80,4 % dans le prélèvement de la deuxième heure.

La durée de l'élévation de la LDH dépasse trois heures mais n'atteint pas 24 heures.

L'accroissement enzymatique obtenu est variable :

1. avec les sujets d'expériences,
2. avec l'anesthésique.

1. — *Avec les sujets d'expérience.*

La LDH subit des modifications de même sens mais assez différentes d'un sujet à l'autre. C'est ainsi qu'après 1 et 2 heures les élévations sont de 84 et 89 pour cent chez un chien et de 30 et 15 % chez un autre par anesthésie à la chloralose, de 130 et 220 d'une part, de 62 et 233 % dans une autre expérience au nembutal, de 25 et 44 % chez un troisième animal.

2. — *Avec l'anesthésique.*

Si tous les anesthésiques que nous avons expérimentés provoquent une élévation de la LDH les variations sont plus importantes avec un barbiturique, le nembutal, 119 %, moyenne des augmentations en 1 et 2 heures.

Les autres anesthésiques donnent durant les deux premières heures des moyennes d'augmentation comparables :

Ether	65 %
Chloralose	54 %
Uréthane	42 %

SIGNIFICATION DE NOS RESULTATS

Dans le plus grand nombre des cas que nous avons pu observer en clinique ou produire par l'expérimentation, la LDH totale du plasma augmente au cours de l'anesthésie.

Cette augmentation est plus importante chez les animaux d'expérience, sans doute parce que le degré de leur anesthésie n'est pas maintenu et réglé au minimum nécessaire comme chez l'homme préparé à une intervention chirurgicale.

Les recherches que nous avons faites sur les isoenzymes montrent que la variation enzymatique ne porte pas particulièrement sur l'une des cinq isoenzymes.

CAUSES DE L'AUGMENTATION DE LA LDH

Les diverses causes sont :

1. L'Augmentation de la glycolyse au cours de l'anesthésie.

La LDH est très abondante dans le muscle et la forte activité spécifique de la lacticodéshydrogénase dans ce tissu tient à l'importance de la glycolyse.

L'augmentation de la glycolyse qui doit se faire au cours de l'anesthésie du fait de la modification des échanges respiratoires serait génératrice de lactate et de pyruvate et le passage d'une plus grande quantité de ces métabolites dans le plasma provoquerait et justifierait l'accroissement de la LDH.

Cette hypothèse indique une cause valable. L'inhibition par le pyruvate signalée par plusieurs auteurs à la suite de Kubowitt et Ott [57] ne l'infirmerait pas, même si le pyruvate était un véritable inhibiteur. Nous avons vu en effet que la réalité de cette inhibition était discutée par Wuntch et ses collaborateurs [154].

2. Suppression d'un inhibiteur.

Des inhibiteurs physiologiques tels que les peptides I et II décrits par Wacker et Schoenenberger [135] dans les urines et dans les muscles pourraient être moins formés dans ceux-ci au cours de l'anesthésie.

Nous ne pouvons pour l'instant que mentionner cette cause éventuelle. Aucune donnée ne permet de la retenir ou de l'abandonner.

Comment le métabolisme musculaire au cours de l'anesthésie comporterait-il une diminution de formation de peptides inhibiteurs ? Rien ne nous apporte une réponse. Une objection se présente cependant. La diminution de libération du peptide I augmenterait l'isoenzyme M_4 et celle du peptide II l'isoenzyme H_4. Ce ne sont pas de telles augmentations qui sont produites sur les électrophorégrammes.

3. L'Altération métabolique des cellules d'un organe pourrait provoquer l'élévation plasmatique de la LDH. Le foie et le muscle devront être envisagés en premier puisqu'ils sont les organes les plus riches en LDH ainsi que l'ont montré Meister [66], Delbruck, Schimassek, Bartsch et Bücher [21].

Origine hépatique

Une légère atteinte hépatique est décelable au cours de l'anesthésie au chloroforme par une augmentation de l'ornithine-carbamyl-transférase. Reichard, Wiqvist et Yllner [90] signa-

lent ce fait au cours d'anesthésies chez des parturientes en indiquant que le maximum de l'élévation se situe au troisième jour.

Il est permis cependant à propos de cette élévation de penser que lors du post-partum l'action de l'anesthésique n'est peut-être pas la seule cause de l'augmentation du taux de l'ornithine-carbamyl-transférase. La grossesse elle-même provoque d'après les mêmes auteurs une élévation modérée de l'O.C.T.

L'hypothèse de Reichard ne peut pas être admise pour expliquer les résultats obtenus pour la LDH pendant l'anesthésie. Une déficience hépatique provoquerait l'augmentation spécifique de l'isoenzyme la plus abondante dans l'organe. Or nous trouvons une augmentation globale des isoenzymes et non pas une seule élévation de LDH_3, LDH_4 ou LDH_5.

Origine musculaire

L'origine musculaire susciterait la même critique et il serait exagéré de penser à une perturbation générale du métabolisme de divers organes, pour expliquer l'augmentation simultanée des cinq isoenzymes de la LDH.

4. L'Interconversion des isoenzymes.

L'hypothèse d'une interconversion entre les isoenzymes a été émise récemment par Fritz et ses collaborateurs [31].

La LDH_5 disparait très vite des cellules en voie de division et de prolifération rapide.

Les autres isoenzymes pourraient, au moyen d'un réarrangement moléculaire des subunités, servir de réserve pour la synthèse.

Cette hypothèse intéressante ne peut s'adapter aux résultats que nous avons obtenus et à l'augmentation absolument parallèle des cinq types d'isoenzymes de la LDH plasmatique.

5. La variation de la perméabilité cellulaire.

Elle serait dès lors la seule cause valable.

L'anesthésique a pénétré dans les cellules; sa présence résulte des modifications de la perméabilité cellulaire ou les provoque.

Que l'anesthésique ait pénétré par un processus passif ou actif, sa pénétration et sa localisation cellulaire vont modifier les membranes et leurs transporteurs.

Nous pensons donc, que même sans lésion cellulaire, les modifications métaboliques pendant l'anesthésie doivent augmenter la sortie des enzymes intracellulaires.

La variation de la perméabilité cellulaire est souvent en cause en pathologie enzymatique, Schapira [102] (et communication verbale).

La LDH est un bon moyen d'étude de cet accroissement de la perméabilité; on sait en effet qu'elle est avec l'aldolase une des enzymes cellulaires les plus labiles, SCHMIDT, SCHMIDT et WILDHIRT [104].

Cette labilité est souvent observée. Les examens systématiques à l'appareil TECHNICON SMA 12 faits au Laboratoire central de Biochimie du Centre hospitalier régional de Purpan, montrent fréquemment une élévation de la LDH supérieure à celle des transaminases.

CONCLUSION

Au cours de l'anesthésie et de la prémédication préalable les taux de la LDH du sérum sont le plus souvent plus ou moins fortement augmentés.

Nous pensons que cet accroissement est dû à une augmentation de la perméabilité et de la clearance cellulaire.

Vu : Le Président de Thèse,

P. VALDIGUIÉ.

Vu et permis d'imprimer

Le Doyen,

G. LAZORTHES.

Bibliographie

1. Aldridge W.N. and Davies D.R. — Determination of cholinesterase activity in human blood. *Brit. Med. J.,* 1952, 1, 945-947.
2. Allen J.M. — Multiple forms of lactic dehydrogenase in tissues of the mouse : their specificity, cellular localization, and response to altered physiological conditions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 1961, 94, 937-951.
3. Appella E. and Markert C.L. — Dissociation of lactate dehydrogenase into subunits with guanidine hydrochloride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 1961, 6, 171-176.
4. Banga J., Szent-Györgyi A. und Vargha L. — Uber das Co-Ferment der Milchsäure-oxydation. *Z. Physiol. Chem.,* 1932, 210, 228-235.
5. Baptist J.N. and Vestling C.S. — Liver lactic dehydrogenase, further inhibition studies. *Feder. Proc.,* 1957, 16, 150.
6. Barnes J.M. and Davies D.R. — Blood cholinesterase levels in workers exposed to organo-phosphorus insecticides. *Brit. Med. J.,* 1951, 2, 816-819.
7. Barnett H. — Electrophoretic separation of lactate dehydrogenase isoenzymes on cellulose-acetate. *Biochem. J.,* 1962, 84, 83 p.
8. Barron E.S.G. and Singer T.P. — Studies on biological oxidations. XIX. Sulfhydryl enzymes in carbohydrate metabolism. *J. Biol. Chem.,* 1945, 157, 221-240.
9. Beisenherz G., Boltze H.J., Bücher T., Czok R., Garbade K.H., Meyer-Arendt E. und Pfleiderer G. — Die Phospho-fructose-aldolase, Phospho-glyceraldehyde-dehydrogenase, Milchsäure-dehydrogenase, Glycerophosphate-dehydrogenase und Pyruvate-kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. *Z. Naturforsch.,* 1953, 8 B, 555-577.
10. Biserte G., Farriaux J.P., Hoste A., Guinamard M.P. et Fontaine G. — La lacticodéhydrase sérique (LDH) et ses isoenzymes : technique d'étude et résultats chez l'enfant. *Ann. Biol. Clin.,* 1966, 24, 663-667.

11. Block R.J., Durrum E.L. and Zweig G. — in A Manual of paper chromatography and paper electrophoresis. *Acad. Press. N.Y.,* 1958, 487.

12. Brechner V.L., Watanabe R.S. and Dornette W.H.L. — Values for serum glutamic oxaloacetic transaminase following anesthesia with fluoromar. *Anaesthesist Analgesia,* 1958, 37, 257-262.

13. Busch A. and Nair P.V. — Inhibition of lactic acid dehydrogenase by fluoropyruvic acid. *J. Biol. Chem.,* 1957, 229, 377-387.

14. Cabaud P.G. and Wroblewski F. — Colorimetric measurement of lactic dehydrogenase activity of body fluids. *J. Clin. Path.,* 1958, 30, 234-236.

15. Cahn R.D., Kaplan N.O., Levine L. and Zwilling L. — Nature and development of lactic dehydrogenases. *Science.,* 1962, 136, 962-969.

16. Chaffee R.R.J. and Bartlett W.L. — Inhibition of lactic dehydrogenase by α-mercapto acids. *Biochem. Biophys. Acta,* 1960, 39, 370-372.

17. Chilson O.P., Costello L. and Kaplan N.O. — Hybridization of lactic dehydrogenases in vitro by concentrated sodium chloride and by reversible inactivation in urea. *J. Molec. Biol.,* 1964, 10, 349-352.

18. Chilson O.P., Costello L. and Kaplan N.O. — Studies on the mechanism of hybridization of lactic dehydrogenases in vitro. *Biochemistry,* 1965, 4, 271-281.

19. Cohen L. and Djordjevich J. — Serum LDH patterns in cardiovascular and other diseases. *J. Lab. and Clin. Med.,* 1964, 64, 355-374.

20. Dawson D.M., Goodfriend T.L. and Kaplan N.O. — Lactic dehydrogenases : Functions of the two types. *Science,* 1964, 143, 929-933.

21. Delbruck A., Schimmassek H., Bartsch K. und Bücher T. — Enzym-Verteilungmuster in einigen Organen und in experimentellen Tumoren der Ratte und der Maus. *Biochem. Z.,* 1959, 331, 297-311.

22. Delbruck A., Zebe E. und Bücher T. — Uber Verteilungsmuster von Enzymen des Energie liefernden Stoffwechsels im Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper von Locusta migratoria und ihre cytologische Zuordnung. *Biochem.* Z., 1958, 331, 273-296.

23. Dennis D. and Kaplan N.O. — D-and-L-lactic acid dehydrogenases in lactobacillus plantarum. *J. Biol. Chem.,* 1960, 235, 810-818.

24. Dewey M.M. and Conklin J.L. — Stark gel electrophoresis of lactic dehydrogenase from rat kidney. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* 1960, 105, 492-494.

25. Dube S.K., Roholt O. and Pressman D. — The chemical nature of the enzyme site of rabbit muscle lactic acid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.,* 1963, 238, 613-617.

26. Emerson P.M. and Wilkinson J.H. — Urea and oxalate inhibition of the serum lactate dehydrogenase. *J. Clin. Pathol.,* 1965, 18, 803-807.

27. Fawcett C.P., Ciotti M.M. and Kaplan N.O. — Inhibition of dehydrogenase reactions by a substance formed from reduced diphosphopyridine nucleotide. *Biochem. Biophys. Acta,* 1961, 54, 210-212.

28. Fondy T.P., Everse J., Driscoll G.A., Castillo F., Stolzenbach F.E. and Kaplan N.O. — The comparative enzymology of lactic dehydrogenases. IV - Function of sulfhydryl groups in lactic dehydrogenases and the sequence around the essential group. *J. Biol. Chem.,* 1965, 240, 4219-4234.

29. Fritz P.J. — Rabbit lactate dehydrogenase isozymes : effect of pH on activity. *Science,* 1967, 156, 82-83.

30. Fritz P.J. and Jacobson K.B. — Lactic dehydrogenases : subfractionation of isozymes. *Science,* 1963, 140, 64-65.

31. Fritz P.J., Vesell E.S., White E.L. and Pruitt K.M. — The roles of synthesis and degradation in determining tissues concentrations of lactate dehydrogenase-5. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.,* 1969, 52, 558-565.

32. Gibson D.M., Davisson E.O., Bachkawat B.K., Ray B.R. and Vestling C.S. — Rat liver lactic dehydrogenase. I-Isolation and chemical properties of the crystalline enzyme. *J. Biol. Chem.,* 1953, 203, 397-409.

33. Gordon A.H., Keil B. and Sebesta K. — Electrophoresis of proteins in agar jelly. *Nature,* 1949, 164, 498-499.

34. Grassmann W. und Hannig K. — Ein einfaches Verfahren zur kontinuierlichen Trennung von Stoffgemischen auf Filterpapier durch Electrophorese. *Naturwissenschaften,* 1950, 37, 397.

35. Green D.E. and Brosteaux J. — The lactic dehydrogenase of animal tissues. *Biochem. J.,* 1936, 30, 1489-1508.

36. Hakala M.T., Glaid A.J. and Schwert G.W. — Kinetics and specificity of lactic dehydrogenase. *Feder. Proc.,* 1953, 12, 213.

37. Hakala M.T., Glaid A.J. and Schwert G.W. — Lactic dehydrogenase. II-Variation of kinetic and equilibrium constants with temperature. *J. Biol. Chem.,* 1956, 221, 191-209.

38. Hauss W.H. und Leppelmann H.J. — I-Uber Anderung von Fermentaktivitäten im Serum als Ausdruck einer unspezifischen Reaktion des Organismus. *Klin. Wschr.,* 1957, 35, 65-70.

39. Hauss W.H. und Leppelmann H.J. — II-Uber Anderung von Fermentaktivitäten in der Leber als Ausdruck einer unspezifischen Reaktion des Organismus. *Klin. Wschr.,* 1957, 35, 71-74.

40. Van der Helm H.J. — Simple method of demonstrating lactic acid dehydrogenase isoenzymes. *Lancet,* 1961, 2, 108-109.

41. Van der Helm H.J., Zondag H.A. and Hartog H.A.P. — Lactic dehydrogenase isoenzymes in myocardial infarction. *Clin. Chim. Acta,* 1962, 7, 540-544.

42. Hess B. — *Enzymes in blood plasma.* Acad. Press., New York, 1963, p. 74.

43. Hess B. und Walter S.J. — Absorptions-Methode zur Differenzierung der Lactatedehydrogenase sowie anderer löslicher Fermente und Proteine in Serum und Geweben. *Klin. Wschr.,* 1961, 39, 213-216.

44. Hess B. and Walter S.J. — Chromatographic differentiation of lactate dehydrogenase of human tissue and serum. *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 1961, 94, 890-897.

45. Hobart M.H. and Rose C.F.M. — Simple method for continous electrophoresis of serum proteins. *J. Clin. Path.,* 1955, 8, 338-340.

46. Holbrook J.J. und Pfleiderer G. — Bedeutung von SH-gruppen für die enzymatische Aktivität. III-Eine Methode, um die essentiellen Cysteinreste in nativer Schweineherz-lactate dehydrogenase (isozym I) radioaktiv zu markieren. *Biochem. Z.,* 1965, 342, 111-114.

47. Holbrook J.J., Pfleiderer G., Schnetger J. and Diemair S. — The importance of SH-groups for enzymic activity. IV-Preparation of the tryptic peptides containing the essential cysteine residues of lactate dehydrogenase, isozymes I and V. *Biochem. Z.,* 1966, 344, 1-14.

48. Hsieh K.M. and Blumenthal H.T. — Serum lactic dehydrogenase levels in various disease states. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* 1956, 91, 626-630.

49. Jordan W.C. and White W. — A standardized method for determination of the isozymes of lactate dehydrogenase of human serum. *Clin. Chim. Acta,* 1967, 15, 457-464.

50. Kanungo M.S. and Singh S.N. — Effect of age on the isozymes of lactic dehydrogenase of the heart and the brain of rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun,* 1965, 21, 454-459.

51. Kaplan N.O. — Symposium on multiple forms of enzymes and control mechanisms. I-Multiple forms of enzymes. *Bact. Rev.,* 1963, 27, 155-169.

52. Kaplan N.O. and Cahn R.D. — Lactic dehydrogenases and muscular dystrophy in the chicken. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.,* 1962, 48, 2123-2130.

53. Kern E., Lo H.W., Flux C.H., Schimmelpfennig H. und Billmann U. — Die photometrische Serumdiastasebestimmung nach Smith und Roe in Klinischer Anwendung. *Klin. Wschr.,* 1957, 35, 572-576.

54. King J. — A routine method for the estimation of lactic dehydrogenase activity. *J. Med. Lab. Techn.,* 1959, 16, 265-272.

55. Kornberg A. — Lactic dehydrogenase of muscle in Colowick S.P. and Kaplan N.O. *Methods in enzymology.* Acad. Press. New-York, 1955, 1, 441-442.

56. Krieg A.F., Gorton S. and Henry J.B. — Effect of temperature on activity and lactate optima of LDH isoenzymes. *Clin. Chim. Acta,* 1967, 17, 363-366.

57. Kubowitz F. und Ott P. — Isolierung und kristallisation eines Gärungsfermentes aus Tumoren. *Biochem. Z.,* 1943, 314, 94.

58. Latner A.L. and Turner D.M. — Clinical application of the effect of acetone on serum lactate dehydrogenase. *Lancet,* 1963, 1, 1293-1294.

59. Lowenthal A., van Sande M. and Karcher D. — Heterogeneity of lactic and malic dehydrogenase in serum, cerebrospinal fluid and brain extracts in man and sheep. *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 1961, 94, 988-995.

60. Mac Donald R.P., Simpson J.R. and Nossal E. — Serum lactic dehydrogenase diagnostic aid in myocardial infarctions. *J.A.M.A.,* 1952, 165, 35-40.

61. Markert C.L. — Lactate dehydrogenase isozymes : dissociation and recombination of subunits. *Science,* 1963, 140, 1329-1330.

62. Markert C.L. — Developmental geneties. *Harvey Lectures,* 1965, 59, 187-218.

63. Markert C.L. and Appella E. — Immunochemical properties of lactate dehydrogenase isozymes. *Ann N.Y. Acad. Sci.,* 1963, 103, 915-929.

64. Markert C.L. and Möller F. — Multiple forms of enzymes : tissue, ontogenic and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA,* 1959, 45, 753-763.

65. Markert C.L. and Ursprung H. — The ontogeny of isozyme patterns of lactate dehydrogenase in the mouse. *Develop. Biol.,* 1962, 5, 363-381.

66. Meister A. — Lactic dehydrogenase activity of certain tumors and normal tissues. *J. Nat. Cancer Inst.,* 1950, 10, 1263-1271.

67. Meyerhof O. und Lohman N.K. — Ueber Atmung und Kohlehydratumsatz tierischer Gewebe. I-Michsäurebildung und Milchsäureschwund in tierischen Geweben. *Biochem. Z.,* 1926, 171, 381-402.

68. Meyerhof O. und Lohman N.K. — Ueber Atmung und Kohlehydratumsatz tierischer Gewebe. II-Ueber den Unterschied von d-und 1-Milchsäure für Atmung und Kohlehydrat-synthese im Organismus. *Biochem. Z.,* 1926, 171, 421-435.

69. Michaelis L. und Menten M.L. — Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.,* 1913 ,49, 333-369.

70. Nachlas M.M., Margulies S.I., Goldberg J.D. and Seligman A.M. — The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt. *Anal. Biochem.,* 1960, 1, 317-326.

71. Neilands J.B. — Studies on lactic dehydrogenase of heart. *J. Biol. Chem.,* 1952, 199, 373-381.

72. Neilands J.B. — Studies on lactic dehydrogenase of heart. III-Action of inhibitors. *J. Biol. Chem.,* 1954, 208, 225-230.

73. Nisselbaum J.S. and Bodansky O. — Reactions of lactic dehydrogenase from various rabbit organs with antirabbit muscle lactic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.,* 1959, 234, 3276-3280.

74. Nisselbaum J.D. and Bodansky O. — Purification and properties of human heart lactic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.,* 1961, 236, 323-327.

75. Novoa W.B., Winer A.D., Glaid A.J. and Schwert G.W. — Lactic dehydrogenase. V-Inhibition by oxamate and by oxalate. *J. Biol. Chem.,* 1959, 234, 1143-1148.

76. Ottolenghi P. and Denstedt O.F. — Mechanism of action of the lactic dehydrogenase of the mammalian erythrocyte. I-Influence of inhibitors. *Canad. J. Biochem.*, 1958, 36, 1075-1083.

77. Ottolenghi P. and Denstedt O.F. — Mechanism of action of the lactic dehydrogenase of the mammalian erythrocyte. II-The mechanism of substrate inhibition. *Canad. J. Biochem.*, 1958, 36, 1085-1091.

78. Pesce A., Fondy T.P., Stolzenbach F., Castillo F. and Kaplan N.O. — The comparative enzymology of lactic dehydrogenases. *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 2151-2167.

79. Pesce A.J., Mc Kay R.H., Stolzenbach F.E., Cahn R.D. and Kaplan N.O. — The comparative enzymology of lactic dehydrogenases. I-Properties of the crystalline beef and chicken enzymes. *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 1753-1761.

80. Pfleiderer G. und Jeckel D. — Individuelle Milchsäuredehydrogenasen bei verschiedenen Säugetieren. *Biochem. Z.*, 1957, 329, 370-380.

81. Pfleiderer G., Jeckel D. und Wieland T. — Zum Wirkungsmechanismus der Milchsäure-dehydrogenase. Die schützende Wirkung von Coenzym-Addukten gegenüber denaturierenden Agentien. *Biochem. Z.*, 1957, 329, 104-111.

82. Pfleiderer G. und Wachsmuth E.D. — Alters und Funktionsabhängige. Differenzierung der Laktatedehydrogenase menschlicher Organe. *Biochem. Z.*, 1961, 334, 185-198.

83. Plagemann P.G.W., Gregory K.F. and Wroblewski F. — The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase. I-Distribution of lactic dehydrogenases in rabbit and human tissues. *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 2282-2287.

84. Plagemann P.G.W., Gregory K.F. and Wroblewski F. — The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase. II-Properties and interrelationships of rabbit and human lactic dehydrogenases isozymes. *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 2288-2293.

85. Pruden E.L., Creason P.L., Creason M.T. and Block W.D. — Protein, enzyme and isoenzyme distribution in human serum fractions obtained by ultracentrifugation. *Clin. Chim. Acta*, 1968, 20, 173-180.

86. Racker E. — Enzymatic synthesis and breakdown of desoxyribose phosphate. *J. Biol. Chem.*, 1951, 196, 347-365.

87. Rapp R.D. and Bell E.R. — Normal values for serum lactic dehydrogenase. *Am. J. Clin. Path.,* 1961, 35, 116-117.

88. Raymond S. and Aurell B. — Two dimensional gel electrophoresis. *Science,* 1962, 138, 152-153.

89. Raymond S. and Weintraub L. — Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science,* 1959, 130, 711.

90. Reichard H., Wiqvist N. and Yllner S. — Chloroform anaesthesia in obstetrics. Its effect on the serum activity of ornithine-carbamyl-transferase, glutamic-oxalacétic-transaminase and glutamic-pyruvic-transaminase. *Acta Obst. Gynec. Scand.,* 1960, 39, 661-674.

91. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry. — Pergamon Press, Oxford, 1961.

92. Ressler N. and Joseph R.R. — Simple method for electrophoretic analysis of serum lactic dehydrogenase. *J. Lab. Clin. Med.,* 1962, 60, 349-353.

93. Ressler N., Schulz J.L. and Joseph R.R. — Factors influencing the electrophoretic migration of lactic dehydrogenase isozymes. *J. Lab. Clin. Med.,* 1963, 62, 571-573.

94. Ressler N., Schulz J.L. and Joseph R.R. — Validity of electrophoretic determination of lactic dehydrogenase isoenzymes. *Nature,* 1963, 198, 888-889.

95. Richterich R. — *Chimie clinique théorique et pratique.* Doin, Paris, 1967, p. 311.

96. Richterich R., Schafroth P. and Aebi H. — A study of lactic dehydrogenase isoenzyme pattern of human tissues by adsorption elution on sephadex-DEAE. *Clin. Chim. Acta,* 1963, 8, 178-192.

97. Roman W. — Quantitative estimation of lactate dehydrogenase isoenzymes in serum. I-Review of methods and distribution in human tissue. *Enzymologia,* 1969, 36, 189-219.

98. Roman W., Oon R.C.S., Gan R.T.H. and Ruys J. — Quantitative estimation of lactate dehydrogenase isoenzymes in serum. II-A simple routine method for the separation of the isoenzymes by heat stability. *Enzymologia,* 1969, 36, 353-370.

99. Rosnowska M., Sawicki Z. and Krawczynski J. — Inhibition of lactate dehydrogenase isoenzymes activity by potassium oxalate and urea in some liver diseases. *Clin. Chim. Acta,* 1968, 20, 7-10.

100. Rossman M.G., Jeffery B.A., Main P. and Warrens S. — The crystal structure of lactic dehydrogenase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA,* 1967, 57, 515-524.

101. Sayre F.W. and Hill B.R. — Fractionation of serum lactic dehydrogenase by salt concentration gradient elution and paper electrophoresis. *Proc. Soc. Exp. Biol.,* 1957, 96, 695-697.

102. Schapira G. et Dreyfus J.C. — Lacticodéshydrogénase plasmatique au cours des myopathies. *C.R. Soc. Biol.,* 1957, 151, 22-23.

103. Schmidt D., Fichler J., Hammer D. und Gabsch H.C. — Einfluss der Narkose auf Enzyme im Blutserum. *Anaesthesist,* 1967, 16, 33-37.

104. Schmidt E., Schmidt F.W. und Wildhirt E. — Aktivitäts-Bestimmungen von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels im menschlichen Serum und in Leberpunktaten bei Lebererkrankungen. II-Ferment-Aktivitäts-Bestimmungen in der menschlichen Leber. *Klin. Wschr.,* 1958, 36, 280-287.

105. Schoenenberger G. and Wacker W. — Isolation and characterisation of a lactic dehydrogenase (LDH) inhibitor of human urine. *J. Clin. Invest.,* 1965, 44, 1096.

106. Scholler K.L., Köhnlein H.E. und Carsjens R. — Uber den Einfluss verschiedener Narkosemittel auf die Enzymaktivitäten des menschlichen Serums. *Anaesthesist,* 1965, 14, 293-296.

107. Schramm W. und Rudorf B. — Uber Ferment-Bestimmungen bei Operierten und Verletzten. *Mschr. Unfallheilk,* 1966, 69, 37-46.

108. Schwartz M.K. and Bodansky O. — Lactic dehydrogenase (Clinical Aspects) in Wood W.A., *Methods in Enzymology,* Vol. IX, Carbohydrate Metabolism *Acad Press. N.Y.,* 1966, 9, 294-302.

109. Schwert G.W. and Winer A.D. — Lactate dehydrogenase in Boyer P.D., Lardy H. and Myrback K. The Enzymes. *Acad. Press. N.Y.,* 1963, 7, 127-148.

110 Smithies O. — Zone electrophoresis in starch gels : group variations in serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.,* 1955, 61, 629-641.

111. Sober H.A. and Peterson E.A. — Protein chromatography on ion exchange cellulose. *Feder. Proc.,* 1958, 17, 1116-1126.

112. Srere P.A. — Enzyme concentrations in tissues. *Science,* 1967, 158, 936-937.

113. Stambaugh R. and Post D. — Substrate and product inhibition of rabbit muscle lactic dehydrogenase heart (H_4) and muscle (M_4) isozymes. *J. Biol. Chem.,* 1966, 241, 1462-1467.

114. Stark G. und Claude B. — Der Einfluss gynäkologischer Operationen auf die Transaminasen (G.O.T., G.P.T.) und Dehydrogenasen (LDH, MDH) im Serum. *Klin. Wschr.,* 1963, 41, 1062-1066.

115. Stark G. und Claude B. — Der Einfluss der Narkose auf die Transaminasen (GOT, GPT) und Dehydrogenasen (LDH, MDH) im Serum. *Anaesthesist,* 1964, 13, 38-40.

116. Straub F.B. — Crystalline lactic dehydrogenase from heart muscle. *Biochem. J.,* 1940, 34, 483-486.

117. Takenaka Y. and Schwert G.W. — Lactic dehydrogenase. III-The mechanism of the reaction. *J. Biol. Chem.,* 1956, 223, 157-170.

118. Terayama H. and Vestling C.S. — Sodium sulfide inhibition of liver lactic dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Acta,* 1956, 20, 586-587.

119. Thelen A. — Untersuchungen über das Verhalten des diastasischen Fermentes im Blut während der Narkose. *Dtsch. Z. Chir.,* 1935, 244, 554-570.

120. Thiers R.E. and Vallee B.L. — Analytical considerations in serum enzyme determinations. *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 1958, 75, 214-226.

121. Thompson R.H.S. — Classification and nomenclature of enzymes. The commission on enzymes of the International Union of Biochemistry recommends measures of standardization. *Science,* 1962, 137, 405-408.

122. Thompson R.H.S. and Trounce J.R. — Serum-cholinesterase levels in diabetes mellitus. *Lancet,* 1956, 1, 656-658.

123. Thunberg T. — Zur Kenntnis des intermediären Stoffwechsels und der dabei wirksamen Enzyme. *Skand. Arch. Physiol.,* 1920, 40, 1-91.

124. Tsao M.U. — Heterogeneity of tissue dehydrogenases. *Arch. Biochem.,* 1960, 90, 234-238.

125. Tsou K.C., Cheng C.S., Nachlas M.M. and Seligman A. M. — Synthesis of some p-nitrophenyl substituted tetrazolium salts as electron acceptors for the demonstration of dehydrogenases. *J. Chem. Soc.,* 1956, 78, 6139-6144.

126. Uriel J. — Les isoenzymes. *Ann. Nutr.,* 1967, 21, B67-80.

127. Valdiguié J. — La lacticodéshydrogénase et ses isoenzymes. *Rev. Méd. Toulouse,* 1968, 4, 211-212.

128. Valdiguié P., Lareng L. et Fourcade A. — Intérêt du dosage des lacticodéshydrogénases sériques dans diverses intoxications. *Anesth. Anal. Réan.,* 1966, 23, 315-321.

129. Vesell E.S. — Significance of the heterogeneity of lactic dehydrogenase activity in human tissues. *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 1961, 94, 877-889.

130. Vesell E.S. and Bearn A.G. — Localization of lactic acid dehydrogenase activity in serum fractions. *Proc. Soc. Exp. Biol.,* 1957, 94, 96-99.

131. Vesell E.S. and Bearn A.G. — Isozymes of lactic dehydrogenase in human tissues. *J. Clin. Invest.,* 1961, 40, 586-591.

132. Vesell E.S. and Elliot S. — Lactate dehydrogenase isozymes : substrate inhibition in various human tissues. *Science,* 1965, 150, 1590-1592.

133. Virtue R.W., Payne K.W., Caranna L.J., Gordon G.S. and Rember R.R. — Observations during experimental and clinical use of fluothane. *Anesthesiology,* 1958, 19, 478-487.

134. Wachsmuth E.D., Pfleiderer G. und Wieland T. — Aminosäure Zusammensetzung von Isozymen der Lactate dehydrogenase aus menschlichen und tierischen Organen. *Biochem. Z.,* 1954, 340, 80-94.

135. Wacker W.E. and Schoenenberger G.A. — Peptide inhibitors of lactic dehydrogenase (LDH). I-Specific inhibition of LDH M_4 and LDH H_4 by inhibitor peptides I and II. *Biochem. Biophys. Res. Commun,* 1966, 22, 291-296.

136. Warburg O. und Christian W. — Isolierung und Krystallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.,* 1942, 310, 384-421.

137. Warburton F.G. and Smith D. — A simple method of differentiating between serum lactate dehydrogenase of cardiac origin and that derived from other tissues. *Enzymologia,* 1963, 26, 125-132.

138. Warburton F.G., Smith D. and Laing G.S. — Inhibition of lactic dehydrogenase isoenzymes. *Nature,* 1963, 198, 386-387.

139. Warburton F.G. and Waddecar J. — Changing lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in the ageing erythrocyte. *Enzymologia,* 1969, 37, 197-202.

140. Wieland T. and Determann H. — Gradienten Chromatographie an DEAE-sephadex. *Experientia,* 1962, 18, 431-432.

141. Wieland T., Duesberg P. und Determann H. — Zum Molekulargewicht der Lactate dehydrogenasen. Studien des Verhaltens bei der Gerfiltration. *Biochem. Z.,* 1963, 337, 303-311.

142. Wieland T. und Pfleiderer G. — Nachweis der Heterogenität von Milchsäuredehydrogenasen verschiedenen Ursprungs durch Trägerelectrophorese. *Biochem. Z.,* 1957, 329, 112-116.

143. Wieland T. and Pfleiderer G. — Chemical differences between multiple forms of lactic acid dehydrogenase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 1961, 94, 691-700.

144. Wieland T., Pfleiderer G. und Ortanderl F. — Uber die Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenasen. III-Vergleiche der Milchsäuredehydrogenasen aus verschiedenen Rattenorganen. *Biochem. Z.,* 1959, 331, 103-109.

145. Wieme R.J. — *Studies on agar-gel electrophoresis.* Bruxelles, Arscia, 1959.

146. Wieme R.J. — Etude par enzymo-électrophorèse des déshydrogénases de l'acide lactique et de la déshydrogénase du sorbitol dans divers tissus chez le rat et la souris blanche. *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1959, 41, 235-341.

147. Wieme R.J. — An improved technique of agar-gel electrophoresis on microscope slides. *Clin. Chim. Acta,* 1959, 4, 317-321.

148. Wieme R.J. — Improved agar support for electrophoresis of LDH isoenzymes. *Clin. Chim. Acta,* 1966, 13, 138-139.

149. Wieme R.J. and van Maercke Y. — The fifth (electrophoretically slowest) serum lactic dehydrogenase as an index of liver injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 1961, 94, 898-911.

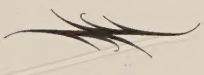
150. Wilkinson J.H. — *Isoenzymes.* Spon Ltd., London, 1965.

151. Wilkinson J.H., Cooke K.B., Elliot B.A. and Plummer D.T. — Some properties of human tissue lactic dehydrogenases. *Biochem. J.*, 1961, 80, 29 p-30 p.

152. Winer A.D. and Schwert G.W. — Lactic dehydrogenase. IV-The influences of pH on the kinetics of the reaction. *J. Biol. Chem.*, 1958, 231, 1065-1083.

153. Wroblewski F. and La Due J.S. — Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1955, 90, 210-213.

154. Wuntch T., Chen R.F. and Vesell E.S. — Lactate dehydrogenase isozymes : kinetic properties at high enzyme concentrations. *Sciences*, 1970, 167, 63-65.

155. Wuntch T., Vesell E.S. and Chen R.F. — Studies on rates of abortive ternary complex formation of lactate dehydrogenase isozymes. *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 6100-6104.

156. Zelitch I. — α-hydroxysulfonates as inhibitors of the enzymatic oxidation of glycolic and lactic acids. *J. Biol. Chem.*, 1957, 224, 251-260.